

骨軟骨組織を変性させる
メカノレスポンスに関する基礎的研究

埼玉県立大学大学院

保健医療福祉学研究科

博士論文

2024年3月

2391001

荒川 航平

【目次】

1. 略語集	2
2. 序論	3
3. 研究 1	11
4. 研究 2	26
5. 研究 3	46
6. 研究 4	60
7. 研究 5	72
8. 総括	93
9. 発表論文・発表学会・獲得助成金一覧	96
10. 謝辞	98
11. 引用文献	99

1. 略語集

本論文において，以下の略語を用いた．

正式名称	略語
Aggrecan	Acan
Anterior cruciate ligament	ACL
ACL transection	ACL-T
Bone volume/Tissue volume	BV/TV
Controlled Abnormal Tibial Translation	CATT
Controlled Abnormal Tibial Rotation	CATR
Collagen type II alpha 1	Col2a1
Destabilized medial meniscus	DMM
Extracellular matrix	ECM
Lateral Anterior	LA
Lateral Posterior	LP
Long Term Hind limb Unloading	LTHU
Medial Anterior	MA
Medial Posterior	MP
Matrix metalloproteinase 3	MMP-3
Matrix metalloproteinase 13	MMP-13
Osteoarthritis	OA
Osteoclast surface / Bone surface	Oc.S/BS
Quality of life	QOL
Short Term Hind limb Unloading	STHU
Tartrate resistant acid phosphatase 染色	TRAP 染色
Tumor necrosis factor- α	TNF- α
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF

2. 序論

2.1. 骨軟骨組織と関節疾患

骨軟骨組織は、全身の関節における関節軟骨や軟骨下骨に代表される組織である。関節は軟骨組織である関節軟骨と、関節軟骨の深層に位置する軟骨下骨で構成される(図1)。関節軟骨はコラーゲン線維とプロテオグリカンから構成される細胞外マトリックスと、軟骨細胞から構成され、70～80%の水分を含有する組織である。コラーゲン線維は軟骨表層では平行に配向するが、深層では垂直方向に配向する。この配向の違いから表層では剪断力や伸張力に抵抗し、深層では圧縮応力に抵抗する働きがある。また、プロテオグリカンは極めて高い保水性があり、荷重などによる圧縮力を支持する役割を持っている。また、軟骨細胞は関節軟骨を構成する唯一の細胞である。健康な軟骨において軟骨細胞は図1に示すように、表層では扁平化した状態で存在し、深層ではより丸みをおび、柱状に集合して存在している。これら軟骨細胞の形態と配列はコラーゲン線維の配向と同様に関節軟骨の深さによって異なる役割を持つ。一方で軟骨下骨は関節軟骨深層の石灰化軟骨層の直下に位置している。軟骨下骨は骨梁構造を有しており、関節に対する軸方向のストレスを分散させる役割を持つ。さらに、軟骨下骨は変形しやすい特徴を持ち、長期的かつ周期的に関節に加わる剪断力や圧縮応力などのメカニカルストレスに対して構造を変化させることで適応している¹⁾。

股関節や膝関節などの荷重関節は、関節運動や、荷重による様々なメカニカルストレスを常に受けている²⁾。周期的かつ持続的なメカニカルストレスは骨軟骨組織を変性させ、関節の機能障害を引き起こし得る³⁾。関節の機能障害を伴う関節疾患は要介護の原因として常に上位に位置しており、関節疾患が多くの高齢者の日常生活動作に支障をきたし、

生活の質の低下，健康寿命の短縮を引き起こし，医療費の増加や労働力の低下につながっていることは明らかである。

関節疾患の代表例として変形性関節症(Osteoarthritis；OA)があげられる。OAは加齢性変性疾患の1つであり，膝関節や股関節といった荷重関節に頻発する。本邦においてOAの中でも特に罹患者が多い変形性膝関節症（Knee osteoarthritis；膝OA）に対する大規模住民コホート **Research on osteoarthritis / osteoporosis against disability (ROAD)** プロジェクトの報告によると^{4,5)}，ベースライン調査全参加者3040人のうちX線像を用いて整形外科医によって診断された膝OAの有病率は54.6%（男性42.0%，女性61.5%）であった。この有病率から推定される膝OAの有病者数は2530万人（男性860万人，女性1670万人），有症状患者数は800万人に達するとされている。さらにROADプロジェクトのベースライン調査における他関節のOAとの合併を調査した結果，全体の84.4%が腰椎，股関節，膝関節のいずれかのOA有病者であることが明らかとなった⁶⁾。この結果からもOAをはじめとした関節疾患は高い罹患率を持っている。

OAは関節疾患の代表とも言える疾患であり，高齢者の身体活動を制限する要因の一つである。現在，OAに対する治療法として，薬物療法などによる対症的な治療や，人工関節全置換術をはじめとした外科的治療法，さらに再生医療による治療法も日々進歩してきている。しかし，疾患の発症や進行を予防する疾患修飾的な治療法は未だ確立されていない⁷⁾。高齢化の一途を辿る本邦において，関節疾患の予防法の確立や進行抑制は医療費や介護負担の増大といった観点からも解決すべき重要な課題である。

2.2. メカニカルストレスに対する骨軟骨組織の応答

股関節や膝関節などの関節は、骨軟骨組織が大きく関与する部位である。関節には表層の関節軟骨と、軟骨の直下に位置する軟骨下骨がある(図1)。

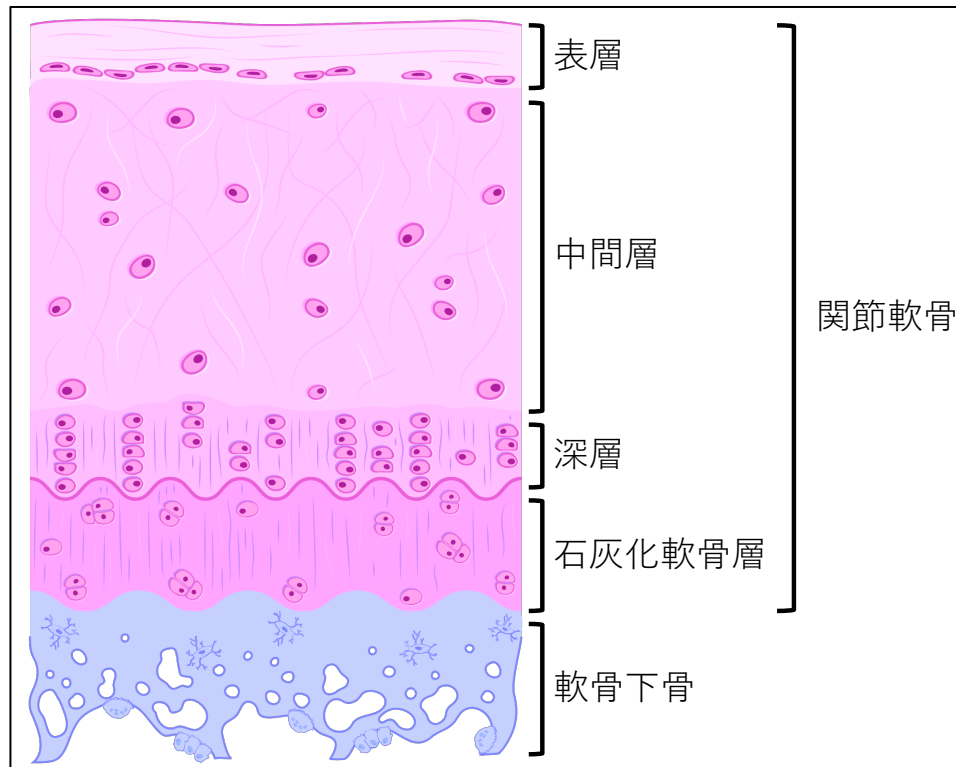


図1. 関節を構成する関節軟骨と軟骨下骨

関節における骨軟骨組織の構造。関節の表層には関節軟骨と、関節軟骨の直下に位置する軟骨下骨が存在する。BioRenderを用いて作成(<https://www.biorender.com/>)。

関節軟骨は、関節に加わるメカニカルストレスを緩衝し、滑らかな関節運動を可能にしている。一方で、軟骨下骨は関節軟骨に加わるメカニカルストレスを吸収分散することで関節機能を支えている。

関節軟骨のメカニカルストレスの応答には軟骨細胞が大きな役割を担っている。軟骨細胞は関節軟骨に存在する唯一の細胞であり、常にメカニカルストレスにさらされている。健康な軟骨細胞は軟骨の機能的特性を維持するための細胞外マトリックスを生成するが、過度もしくは低

負荷すぎるメカニカルストレスは軟骨細胞の代謝活性の低下や⁸⁾、異化作用の促進を引き起こすことが明らかになっている⁹⁻¹¹⁾。これらより、軟骨に加わるメカニカルストレスが軟骨細胞の健康に大きく影響していることが明らかである。

一方で、メカニカルストレスに対する軟骨下骨の特徴として、関節軟骨を支えるクッションの役割があると考えられている¹²⁾。そして、疾患進行に伴い生じる軟骨下骨の異常なリモデリングは軟骨下骨の硬さの変化を引き起こし¹³⁻¹⁶⁾、表層の関節軟骨に加わるメカニカルストレスが変化するとされている¹²⁾。この軟骨下骨の機能やメカニカルストレスに対する応答には、破骨細胞と骨芽細胞による骨リモデリングが関与している。軟骨下骨において破骨細胞と骨芽細胞は骨髄腔に存在する。これまでに、OA 進行過程において発症初期に破骨細胞の活性化が生じ、疾患進行に伴い骨芽細胞による骨形成が生じるとされているが¹⁷⁾、軟骨下骨におけるメカノレスポンス機構は未解明である。

これら関節軟骨と軟骨下骨のメカニカルストレスに対する応答は個々に生じるが、関節軟骨と軟骨下骨の境界は骨・軟骨組織が協調的かつ相乗的に作用する関節機能と障害の中心となる領域であり^{17,18)}、骨軟骨領域の変化には、軟骨変性や軟骨欠損、軟骨下骨の厚さの増加、骨梁構造の変化、骨髄病変などが挙げられ、関節軟骨・軟骨下骨の一方が変化すると他方の特性と機能に影響することが明らかになっている(図2)¹⁹⁾。従って、骨軟骨組織を一つの機能的ユニットとして捉え、メカニカルストレスに対する各組織がどのように応答するのかを評価していく必要がある。

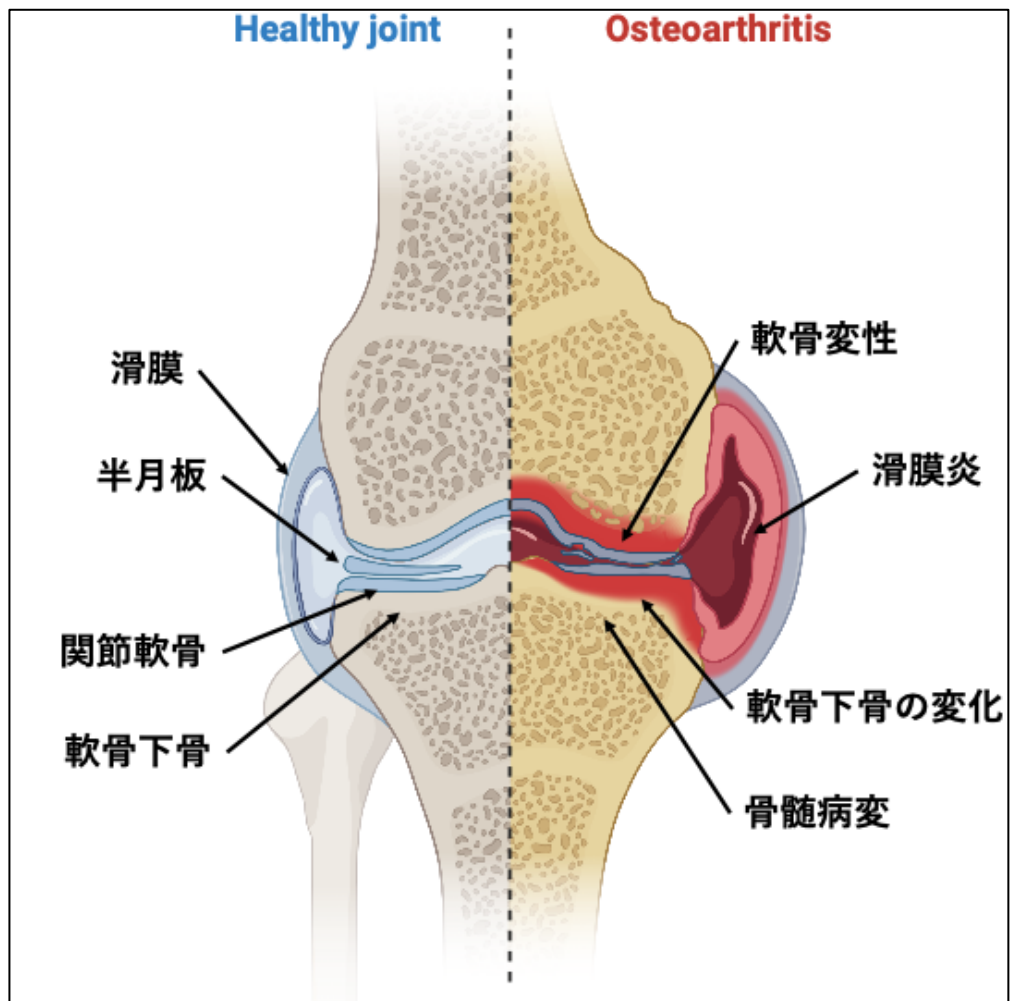


図 2. 骨軟骨組織の変性・変化

関節における骨軟骨組織の変性・変化。関節軟骨・軟骨下骨の一方が変化すると他方に影響を与える。関節軟骨と軟骨下骨は一つの機能的ユニットとして捉える必要がある。BioRender を用いて作成 (<https://www.biorender.com/>)。)

2.3. 関節疾患とメカニカルストレスの関係

関節の形成には正常なメカニカルストレスが必要とされており^{20,21)}、変形性関節症をはじめとした関節疾患にはメカニカルストレスが大きく関与している²²⁾。関節に加わるメカニカルストレスには、剪断力、圧縮応力、伸張力、浄水圧などが挙げられ、これら複数のメカニカルストレスが常に加わっている²⁾。また、歩行中に膝関節に加わる生理学的荷重

は 0.8～6.3MPa, その際の歪みは 10%以内であるとされている²³⁾. これまでの研究で, 歩行などを通して関節に加わるメカニカルストレスは関節軟骨の変性に対して強度依存的に作用するとされており, 適度なメカニカルストレスは軟骨保護に作用し, 過度なメカニカルストレスは軟骨変性を引き起こすことが明らかとなっている^{24,25)}. 一方で, 脛骨に対する軸方向のメカニカルストレスは骨形成を促進し, 後肢懸垂などメカニカルストレスの減少は骨体積の減少を招き, 骨吸収を促進することが明らかになっている^{26,27)}. これらメカニカルストレスに対する骨の応答は Wolff の法則として知られている. 関節における軟骨下骨も Wolff の法則に従い, 軟骨下骨は破骨細胞と骨芽細胞の作用によるリモデリングによって適応することができる¹⁾.

これらより軟骨と軟骨下骨は, とともにメカニカルストレスに対して応答することで関節を形成, 恒常性を維持しており, 異常なメカニカルストレスは骨軟骨組織の恒常性の破綻を招くことが明らかになっている. しかし, 関節には常に剪断力や圧縮応力など複数種類のメカニカルストレスが加わっており²⁾, メカニカルストレスの質が異なることは明確である. これに対して, これまでの報告はメカニカルストレスの強度に着目した報告に限られている. そのため, メカニカルストレスの強度だけでなく, その種類といった質の違いを考慮した検証が求められる.

2.4. 研究目的

これらより、関節疾患の発症・進行メカニズムにおいて、メカニカルストレスに対する骨軟骨組織のメカノレスポンス機構が関与することは明らかである。しかし、メカニカルストレスの種類・質が骨軟骨組織を如何にして変性させるのか、そのメカニズムは未解明である。現在、OAなどの関節疾患に対しては、外科的手術や軟骨再生を目指した治療法は確立されはじめているものの、これらは発症要因を特定して解決するものではないため、根本的治療にはなり得ない。さらには、発症初期の段階に対しては、疼痛緩和などの対症療法がスタンダードとなっており、明確な疾患修飾療法は確立されていない。超高齢化社会の一途を辿る本邦において、要介護の要因になる関節疾患の予防法確立は喫緊の課題となっており、リハビリテーション分野においても骨軟骨組織の変性を予防する方略の確立が求められている。そこで本研究では以下の研究 1-5 を通して、メカニカルストレスの種類・質に着目し、骨軟骨組織を変性させるメカノレスポンス機構の基盤解明を目的とした。

研究 1；生体内のメカニカルストレスの増減を再現するモデル確立

既存の動物モデルで生じる関節不安定性による剪断力増大に着目し、関節不安定性を抑制する新規のモデルを確立し、剪断力が関節軟骨変性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

研究 2；メカニカルストレスの異なるモデルの骨・軟骨変性の違い

研究 1 で確立したモデルを用いて、生体内での剪断力と圧縮応力の増減が異なるモデルの軟骨変性と軟骨下骨の構造変化を比較し、メカニカルストレスの違いが軟骨と軟骨下骨に与える影響の違いを明らかにすることを目的とした。

研究 3 ; 異なるモデルにおける部位特異的な軟骨下骨の変化の違い

研究 2 で用いたメカニカルストレスの異なるモデルの脛骨軟骨下骨の領域毎の骨構造変化と半月板の変性を評価し，接触領域の変化や半月板変性による脛骨関節面に対する圧縮応力の変化と軟骨下骨の骨構造変化の関連解明を目的とした．

研究 4 ; 異なる関節における圧縮応力の減少が骨軟骨組織に与える影響

研究 1-3 でみられた変化が膝関節特異的かつ週齢特異的なのかを検証するため，発育期のマウスを対象に後肢懸垂による股関節への圧縮応力の減少を再現し，荷重関節部の骨軟骨組織形成におけるメカニカルストレスの役割を明らかにすることを目的とした．

研究 5 ; 軟骨下骨の硬さが軟骨細胞メカノレスポンスに与える影響

新規の培養基材を用いて軟骨下骨の硬さ変化を再現し，軟骨細胞を 3 次元培養する．異なる硬度のゲルに培養した軟骨細胞に対して剪断力を付与することで軟骨下骨の硬さ変化が軟骨細胞のメカノレスポンスに与える影響を明らかにすることを目的とした．

3. 研究 1 ; 生体内のメカニカルストレスの増減を再現するモデル確立

3.1. 目的

これまでに OA 動物モデルとして、膝前十字靭帯(Anterior cruciate ligament ; ACL)を切断する ACL 切断(ACL Transection ; ACL-T)モデルに代表される関節周囲の靭帯を切断する動物モデルが用いられている。中でも Glasson らが報告した内側半月板不安定化(Destabilization of the Medial Meniscus ; DMM)モデルは²⁸⁾、再現性の高いモデルとして多くの研究で用いられている。これら外科的 OA モデルの多くは靭帯を切断することで生じる関節不安定性による剪断力の増大が関節に対して異常なメカニカルストレスとして作用することで関節軟骨変性が生じることが明らかになっている。

半月板は関節の適合性を高め、関節の安定化に寄与することに加え、関節の圧縮応力を分散する機能を有する²⁹⁾。また、膝 OA 患者において脛骨の回旋異常が生じ、半月板の変性もあわせて生じている³⁰⁻³⁴⁾ことから半月板による関節の適合性が回旋不安定性を抑制し、膝 OA 患者の脛骨回旋方向の不安定性には半月板の変性が寄与している可能性が高い。そのため、内側半月板の機能不全が生じる DMM モデルでは関節の不安定性による剪断力増大に加えて圧縮応力の増大が生じていると考えられる。よって、本研究では DMM モデルで生じる回旋方向の関節不安定性を抑制する Controlled Abnormal Tibial Rotation (CATR)モデルを確立し、関節不安定性の抑制による剪断力の軽減が、関節軟骨変性に及ぼす影響を明らかにすることとした。

3.2. 方法

3.2.1. 倫理的配慮

本学研究倫理審査委員会の承認後（承認番号 29-13），動物実験基本計画書ならびに実施計画書に従い研究を実施した．実験動物に対し，外科的介入への疼痛軽減措置を実施した．

3.2.2. 研究デザイン

ICR 系雄性マウス 12 週齢 20 匹を対象とした．対象を DMM 群と CATR 群, INTACT 群(DMM 群の対側肢)の計 3 群に割り当てた(図 3A)．対象組織を左後肢の膝関節とし，モデル作製から 8・12 週間後に組織を採取した．その後，関節不安定性の評価，半月板と関節軟骨の組織学的解析を実施した．

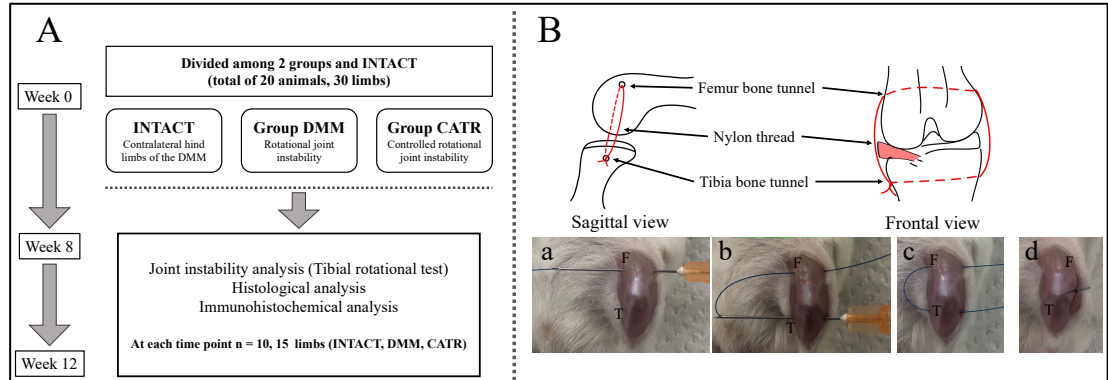


図 3. 研究デザインと CATR モデルの作製方法

(A)研究デザイン．(B)CATR モデルのシェーマ．(B-a,b)大腿骨と脛骨に骨孔を作製．(B-c,d)ナイロン糸を貫通させループ状に緊縛した．

3.2.3. 飼育方法

マウスはポリカーボネート製ゲージの中で飼育した．水や飼料には自由にアクセスできるようにした．飼育室の環境は室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $55\pm 5\%$ ，12 時間サイクルで明暗とした．

3.2.4. 実験モデル作製

浅麻酔はイソフルラン（イソフルラン吸入麻酔薬「ファイザー」1ml/1ml；ファイザー株式会社，東京，日本）を充満させたプラスチック容器内での吸入麻酔を実施した．その後，深麻酔として三種混合麻酔薬を皮下に投与した後に，外科的介入を行なった．外科的介入後，メドトミジン拮抗薬（アンチセダン；大塚製薬社，東京，日本）を生理食塩水（株式会社大塚製薬工業，東京，日本）で希釈後，用量 0.1ml/10g を皮下注射した．

DMM モデルは先行研究の方法に則り作製した²⁸⁾．膝関節前面を縦切開し，膝蓋腱内側から関節包内に侵入させた剪刀を用いて内側の脛骨半月靭帯を切断した．脛骨半月靭帯切断後，切開した関節包，皮膚を縫合糸で閉創した．CATR モデルは半月板不安定化による回旋方向の不安定性を抑制するために 25G の注射針（Terumo Co, Ltd, JPN）を用いて大腿骨遠位と脛骨近位に骨孔を作製し，骨孔に 4-0 ナイロン糸（Akiyama Co, Ltd, JPN）を貫通させ，ループ状に緊縛した．DMM 群に関しても外科的介入の差による影響を少なくするために骨孔を作製し，ナイロン糸によるループを緩くかけた（図 3B）．

3.2.5. 組織採取

モデル作製から 8・12 週時点でマウスを頸椎脱臼法にて安楽死させた．その後，対象となる左後肢を採取した．採取後，関節不安定性の解析を実施し，4%Paraformaldehyde リン酸緩衝液にて 48 時間固定，10%エチレンジアミン四酢酸溶液にて 3 週間脱灰処理を実施し，パラフィン置換によってパラフィンプロックを作成した．

3.2.6. 関節不安定性の評価

DMM モデルで生じる回旋方向の関節不安定性の評価として、側方牽引装置(図 4A)と、軟 X 線装置 M-60 (Softex Co, Ltd, JPN) を用いて撮影した。撮影手順として、対象肢を採取、大腿骨頭を切断、大腿骨近位 1/2 の大腿四頭筋、ハムストリングスをトリミングした後、側方牽引装置に膝関節 90° 屈曲位で固定し、定性ばね (Sanko spring Co, Ltd, JPN) を用いて 0.05kgf の力で脛骨を内側に牽引した状態を維持し膝関節の上方から大腿骨の長軸に対して垂直に撮影した。その後、外側に牽引した状態でも撮影した。撮影条件は電圧 30kV, 電流 1.5mA, 露光時間 1 秒とし、画像はデジタル画像センサー NAOMI (RF Co, Ltd, JPN) によってデジタル化した。回旋方向の関節不安定性は、牽引時に脛骨骨幹部に 25G の注射針 (Terumo Co, Ltd, JPN) を貫通させ基準とし、内外側から牽引した際の注射針のなす角度の角度変化を脛骨の回旋角度変化量として定義し、画像処理ソフトウェア Image J (U.S. National Institutes of Health, MD, USA) で定量化した(図 4B)。

3.2.7. 関節軟骨・半月板の組織学的解析

3.2.7.1. 組織標本作製

採取した膝関節から作成したパラフィンブロックをマイクロトーム ROM380 (Yamato Kohki Industrial Co, Ltd, JPN) にて矢状断切片 (6 μ m) を作成した。

3.2.7.2. 一般染色

関節軟骨変性を評価するために一般的に用いられる Safranin O Fast Green 染色を行った。染色した切片はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE CO, JPN) を用いて撮影し、Osteoarthritis research society international (OARSI) によって推奨されている関節軟骨変性 (OARSI) スコア³⁵⁾に基づいて解析を実施した。半月板変性は Kwok らの報告³⁶⁾をもとに、スコアリングによる半月板変性の重症度を評価した。半月板のスコアリングは、Safranin O Fast Green 染色にて前節と後節の半月板を評価するものであり、半月板の表面構造、染色性、細胞性を評価し、半月板変性の重症度を Grade 0 から Grade 4 の 5 段階で分類する評価方法である。スコアリングはランダム化した組織像を 2 名の共同研究者が独立して採点し、2 名の評価者のスコアの平均値をスコアとした。

3.2.7.3. 免疫組織化学染色

軟骨変性に関与する炎症性因子である tumor necrosis factor- α (TNF- α) と軟骨変性因子である matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) の局在性と発現を評価するため、VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories) のプロトコルに基づいて、Avidin-Biotinylated enzyme Complex 法を用いて免疫組織化学染色を実施した。組織切片に対してキシレン、エタノールを用いて脱パラフィン処理を行い、Proteinase K (Worthington Biochemical) にて抗原賦活化処理を行った。その後、内因性ペルオキシターゼ活性を抑制するために 0.3%過酸化水素 (FUJIFILM Wako) を含むメタノールに 30 分間浸漬させた。正常動物血清 (Vector Laboratories, USA) を用いてブロッッキングを行った。

後，一次抗体を Rabbit Anti-TNF- α antibody（希釈濃度 1/300；bs-2081R; Bioss）と，Rabbit Anti-MMP 13 antibody（希釈濃度 1/300；bs-0575R; Bioss）とし 4°Cにて一晩反応させた．翌日二次抗体には Anti-Rabbit IgG Biotinylated Antibody（Vector Laboratories）を用いた．増感反応には，VECTASTAIN ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories) を使用した．発色にはヒストファイン DAB 基質キット(株式会社ニチレイバイオサイエンス，JPN)を用いた．発色後にティッシュ・テック マイヤーヘマトキシリンにて対比染色を行った．解析は，ランダムに選択された関節軟骨領域 10000 (100×100) μm^2 における陽性細胞率を算出した．

3.2.8. 統計解析

全てのデータに対し Shapiro-Wilk 検定による正規性の検証を行った．OARSI スコアと半月板変性スコア，TNF- α と MMP-13 の陽性細胞率の比較に対しては，Kruskal-Wallis 検定を使用した．その後，多重比較として Steel-Dwass 法を用いた．関節不安定性の比較に対しては，一元配置分散分析を使用した．その後，多重比較として Tukey-Kramer 法を用いた．統計解析には，統計解析ソフト R version 3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用した．有意水準を 5%とした．

3.3. 結果

3.3.1. 関節不安定性の解析結果

関節不安定性の解析結果を図 4 に示した. 8 週時点において, DMM 群の関節不安定性は他の群と比較して有意に増大していた (DMM vs. INTACT, $p = .001$; DMM vs. CATR, $p = .011$). 12 週時点では有意差は認めないものの, DMM 群の関節不安定性が増大する傾向を示した.

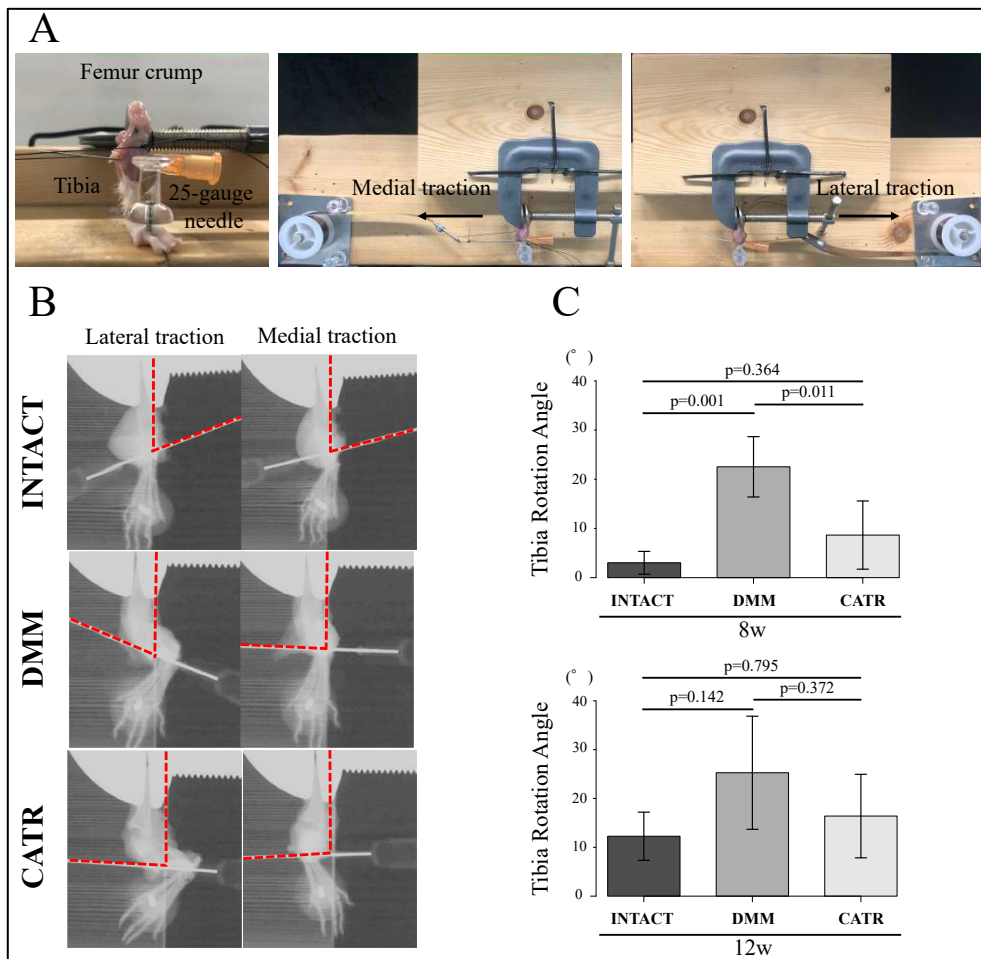


図 4. 関節不安定性の解析結果

(A)側方牽引試験. (B)側方牽引時の撮影図. 図の赤線の角度を測定し, 回旋角度を算出した. (C)関節不安定性の解析結果. 8 週・12 週時点で共に DMM 群の関節不安定性が増加し, CATR 群では関節不安定性が抑制された. データは平均値±95%CI で示す.

3.3.2. 関節軟骨変性の比較

関節軟骨の染色像と OARSI スコアによる解析結果を図 5 に示した。DMM 群では 8 週時点で軟骨表層の変性が確認されたが、CATR 群では染色性の低下や構造変化はみられなかった。OARSI スコアによる比較では、8 週時点において、DMM 群の OARSI スコアが他の群と比較して有意に高値を示した (DMM vs. INTACT, $p = .038$; DMM vs. CATR, $p = .034$)。12 週時点では DMM 群の OARSI スコアが INTACT 群と比較して有意に高値を示した (DMM vs. INTACT, $p = .023$) が、CATR 群は DMM 群の OARSI スコアよりも低値を示し、INTACT 群と有意差は認めなかった。

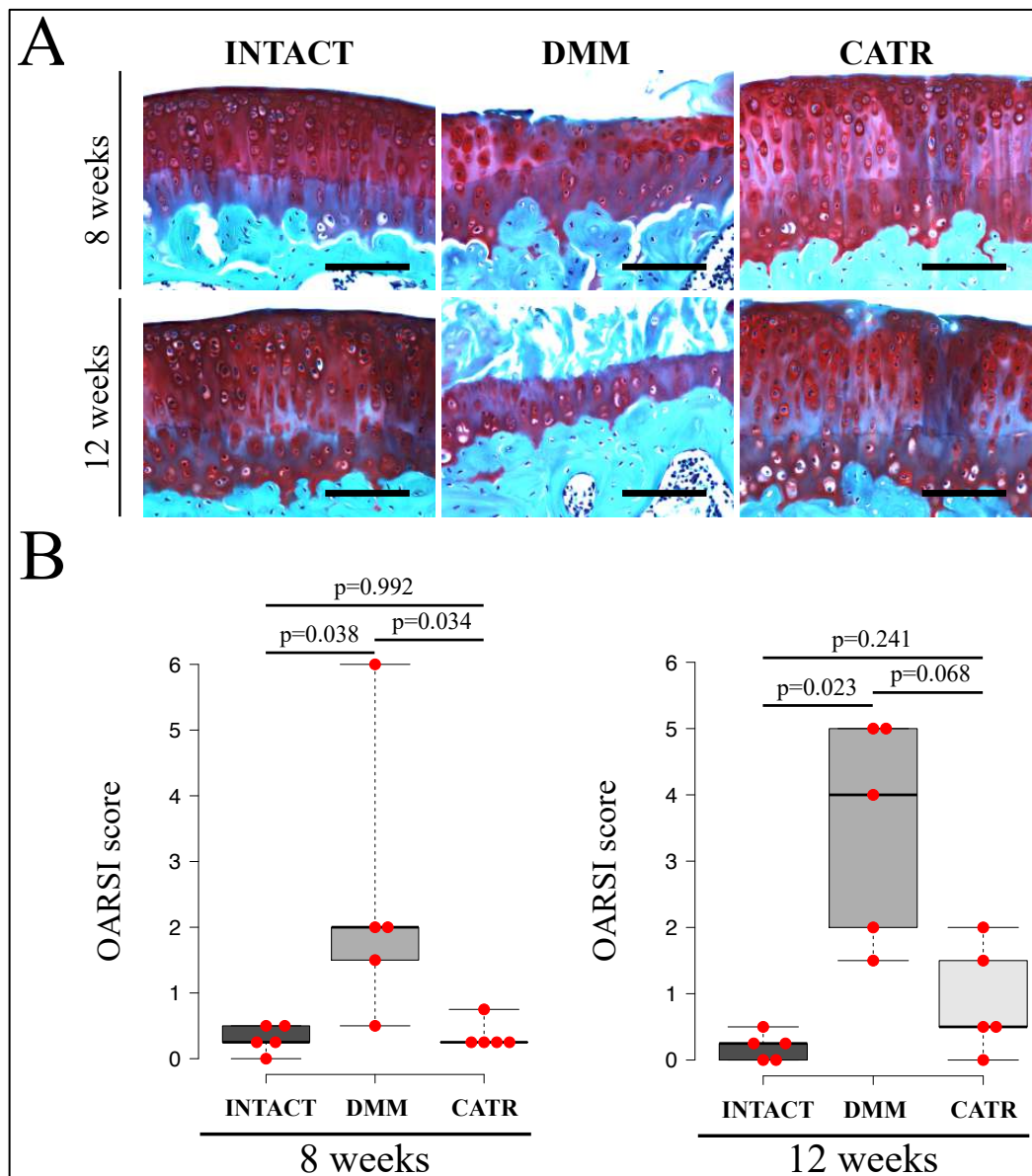


図 5. 関節軟骨変性の解析結果

(A)各群の代表的な染色画像．DMM 群では関節軟骨変性が顕著に確認された．(B)OARSI スコアによる解析結果．8 週，12 週時点で共に DMM 群の OARSI スコアが最も高値を示し，CATR 群の OARSI スコアは DMM 群と比較して低値であった．データは中央値[四分位範囲]で示す．

3.3.3. 半月板変性の比較

半月板の染色像とスコアリングによる解析結果を図 6 に示した。8 週時点において、DMM 群と CATR 群では半月板の構造変化や変性所見を認めるものの、INTACT 群と比較して変性スコアに有意差はみられなかった。12 週時点では DMM 群と CATR 群では半月板の構造変化や表層の細胞凝集などの変性所見が増悪傾向であり、INTACT 群と比較して変性スコアが有意に高値を示した (DMM vs. INTACT, $p = .017$; CATR vs. INTACT, $p = .021$)。また、8・12 週時点で DMM 群と CATR 群の半月板変性スコアに有意差は認めなかった。

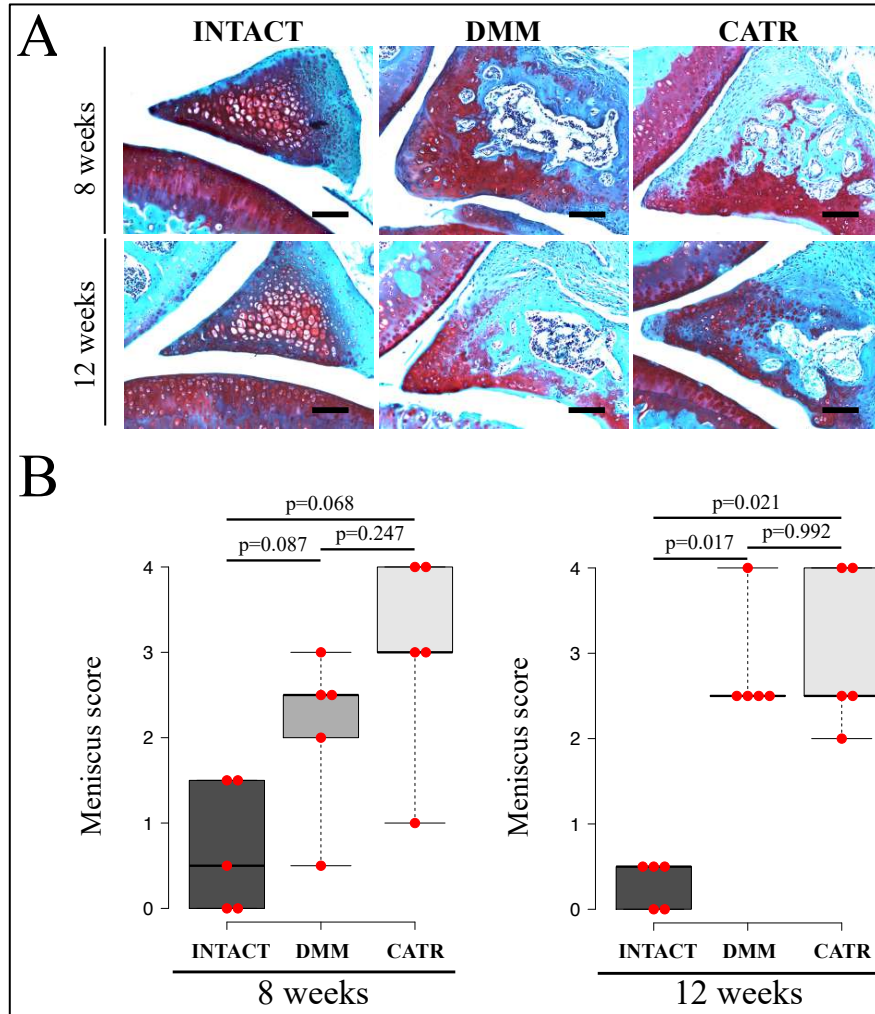


図 6. 関節軟骨変性の解析結果

(A)半月板の代表的な染色画像. DMM 群, CATR 群では半月板の染色性や構造変化が確認された. (B)半月板変性スコアによる解析結果. 8 週, 12 週時点で共に DMM 群と CATR 群の変性スコアに差はみられなかった. データは中央値[四分位範囲]で示す.

3.3.4. 関節軟骨異化因子の染色結果

免疫組織化学染色による TNF- α と MMP-13 の染色像と、陽性細胞率による解析結果を図 7 に示した。8 週時点において、DMM 群の TNF- α の陽性細胞率は他の群と比較して有意に高値を示した (DMM vs. INTACT, $p = .024$; DMM vs. CATR, $p = .024$)。一方で、DMM 群と CATR 群の MMP-13 の陽性細胞率が INTACT 群と比較して有意に高値を示した (DMM vs. INTACT, $p = .024$; CATR vs. INTACT, $p = .024$)。また、12 週時点で DMM 群の TNF- α の陽性細胞率は他の群と比較して有意に高値を示し (DMM vs. INTACT, $p = .024$; DMM vs. CATR, $p = .024$)、CATR 群の TNF- α の陽性細胞率は INTACT 群と比較して有意に高値を示した (CATR vs. INTACT, $p = .043$)。そして 12 週時点における MMP-13 の陽性細胞率は DMM 群が他の群と比較して有意に高値を示した (DMM vs. INTACT, $p = .024$; DMM vs. CATR, $p = .024$)。

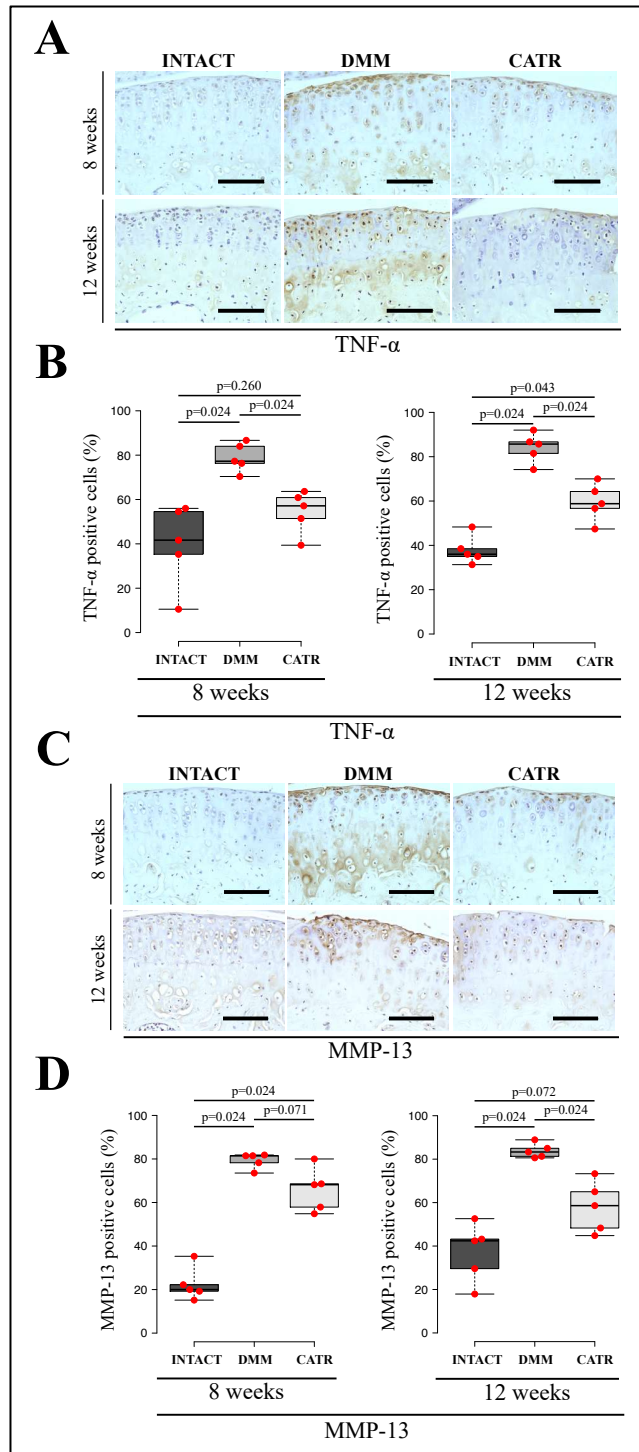


図 7. 免疫組織化学染色の解析結果

(A)TNF- α の代表的な染色画像. (B) TNF- α 陽性細胞率の解析結果. 8 週, 12 週時点共に DMM 群の陽性細胞率が高値を示した. (C)MMP-13 の代表的な染色画像. (D) MMP-13 陽性細胞率の解析結果. 8 週, 12 週時点共に DMM 群の陽性細胞率が高値を示した. データは中央値[四分位範囲]で示す.

3.4. 考察

本研究は、内側半月板の機能不全が生じる DMM モデルの関節不安定性を抑制する CATR モデルを確立し、関節不安定性による剪断力が関節軟骨変性に及ぼす影響を検証した。関節不安定性の解析結果は、CATR モデルが DMM モデルで生じる関節不安定性を抑制できていることを示し、剪断力を軽減したモデルとして確立されたことを示唆している。

CATR 群の OARSI スコアは、DMM 群と比較して低値を示した。関節軟骨変性は関節不安定性の大きさに依存することが明らかになっている³⁷⁾。さらにラット ACL-T モデルにおいて、前後方向の関節不安定性を抑制すると軟骨変性が抑制することが報告されている^{38,39)}。これらより、ACL-T モデルの前後方向の関節不安定性に加えて、回旋方向の関節不安定性も関節軟骨変性を引き起こす要因であることを示した。しかし、12 週時点では DMM 群と CATR 群の OARSI スコアに有意差はみられなかったことから、関節不安定性の抑制による関節への剪断力の軽減は軟骨変性を完全に予防することはできないことを示唆している。

TNF- α の発現は軟骨細胞の異化作用を促進し、軟骨細胞の恒常性を乱す。TNF- α は OA において重要な炎症性サイトカインであり、MMP-13 をはじめとしたタンパク質分解酵素の産生を誘導する⁴⁰⁻⁴²⁾。また、軟骨細胞に対して過度の剪断力を加えると TNF- α や MMP-13 などの異化因子の発現が増加することが明らかとなっている⁴³⁾。本研究では、関節不安定性が増大した DMM 群では関節軟骨における TNF- α や MMP-13 の発現が増加し、軟骨変性が確認された。一方で、関節不安定性を抑制した CATR 群では TNF- α や MMP-13 の発現が DMM 群と比較して低値を示し、軟骨変性が抑制されていた。これらの結果から、関節不安定性による剪断力の増大が軟骨異化因子の発現を誘導し、DMM 群における

軟骨変性を引き起こした可能性を示唆しており、関節不安定性の抑制は関節軟骨における軟骨異化因子の発現を抑制することを示している。

一方で、半月板の変性は DMM 群と CATR 群で同程度認められ、半月板変性スコアに有意差はみられなかった。半月板の組織重量の 70%は水分であり、残りは細胞外マトリックスと細胞によって構成され、コラーゲンとグリコサミノグリカンが多くを占めており、関節軟骨と類似した組成を持つ^{44,45)}。半月板の主な機能は関節の適合性を高め、圧縮応力を分散させることである。本研究結果では、8 週、12 週時点の DMM 群、CATR 群ともに半月板の構造変化を伴う染色性の低下を認めた。したがって、DMM 群、CATR 群ともに半月板の機能不全による圧縮応力の増大が生じていることが推察される。

これらの結果をまとめると、半月板の変性は DMM 群と CATR 群の両群で確認されたが、軟骨変性は DMM 群でより重度であった。これらから、DMM 群における軟骨変性は剪断力増大が強く関与することが明らかとなった。さらに、DMM 群と同程度の半月板変性を CATR 群で認めたことから、CATR モデルは DMM モデルで生じる剪断力を軽減するが、半月板機能不全による圧縮応力増大が残存するモデルとして確立された。

本研究の限界として関節不安定性による剪断力の増大に焦点を当てたが、関節不安定性は、静的不安定性のみの解析であった。したがって、歩行など動的環境下での関節不安定性を評価する必要がある。さらに、本研究では、関節軟骨の変性にのみ着目した。関節疾患は、軟骨だけでなく軟骨下骨をはじめとした関節全体の疾患であり、特に関節軟骨と軟骨下骨は機能的ユニットとして作用し、生物学的相互作用を有することから今後は関節軟骨に加え、軟骨下骨の変化も解析していく必要がある。

4. 研究 2 ; メカニカルストレスの異なるモデルの骨・軟骨変性の違い

4.1. 目的

関節軟骨変性や軟骨下骨の変化にはメカニカルストレスが強く関与することは明らかである。膝関節に加わるメカニカルストレスには剪断力や圧縮応力など複数の種類がある²⁾。研究 1 では DMM モデルで生じる剪断力と圧縮応力に着目し、剪断力を軽減する CATR を確立し、CATR モデルは DMM モデルの軟骨変性を抑制することを明らかにした(発表論文 1)。我々はこれまでに ACL-T モデルで生じる関節不安定性の抑制は軟骨変性を抑制することを明らかにした⁴⁶⁾。これらの成果から、関節軟骨変性には関節不安定性による剪断力の増大が関与することは明らかであるが、圧縮応力が如何に骨関節組織の変性に寄与するかは未解明である。

そこで、本研究では ACL と半月板の機能の違いに着目した。ACL は膝関節に対して加わる前後方向の剪断力に対し最も抵抗する組織である。そのため、ACL 切断は膝関節に対して前後方向の剪断力が増大させる。一方、半月板は関節の安定化と圧縮応力の分散を担うため、半月板の機能不全は関節不安定性による剪断力と圧縮応力が増大する。これらから、OA 動物モデルである ACL-T モデルでは剪断力の増大し、DMM モデルでは剪断力に加え、圧縮応力の増大が生じることが考えられる。この点に着目し、CATR モデルと同様に、ACL-T モデルで生じる前後方向の関節不安定性を抑制する Controlled Abnormal Tibial Translation (CATT) モデルを確立し、生体内での剪断力と圧縮応力の増減を再現した。

これらから本研究の目的は、生体内でのメカニカルストレスの違いを再現したモデル間の比較から剪断力と圧縮応力が骨軟骨組織のメカノレスポンス機構に与える影響を明らかにすることとした。

4.2. 方法

4.2.1. 倫理的配慮

本学研究倫理審査委員会の承認後（承認番号 2020-1），動物実験基本計画書ならびに実施計画書に従い研究を実施した．実験動物に対し，外科的介入への疼痛軽減措置を実施した．

4.2.2. 研究デザイン

ICR 系雄性マウス 12 週齢 59 匹を対象とした．生体内での剪断力と圧縮応力の増減を再現するために，ACL を切断し前後方向の関節不安定性による剪断力が増大する ACL-T 群，ACL-T モデルに対して関節不安定性を抑制する CATT 群，半月板機能不全による関節不安定性と圧縮応力増大が生じる DMM 群，DMM モデルに生じる脛骨回旋方向の関節不安定性を抑制する CATR 群，Sham 群の計 5 群に割り当てた．対象組織を左後肢の膝関節とし，モデル作製から 4・6 週間後に組織を採取した．その後，関節不安定性の評価，組織学的解析，マイクロ CT による骨形態学的解析を実施した．

4.2.3. 飼育方法

マウスはポリカーボネート製ゲージの中で飼育した．水や飼料には自由にアクセスできるようにした．飼育室の環境は室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $55\pm 5\%$ ，12 時間サイクルで明暗とした．

4.2.4. 実験モデル作製

浅麻酔はイソフルラン（イソフルラン吸入麻酔薬「ファイザー」1ml/1ml；ファイザー株式会社，東京，日本）を充満させたプラスチック

ク容器内での吸入麻酔を実施した。その後、深麻酔として三種混合麻酔薬を皮下に投与した後に、外科的介入を行なった。外科的介入後、メデトミジン拮抗薬（アンチセダン；大塚製薬社，東京，日本）を生理食塩水（株式会社大塚製薬工業，東京，日本）で希釈後，用量 0.1ml/10g を皮下注射した。

三種混合麻酔薬は塩酸メデトミジン（ドミトール 0.75mg/kg；日本全薬工業株式会社，福島，日本）とミダゾラム（ドルミカム 4mg/kg；サンド株式会社，東京，日本）と酒石酸ブトルフェール（ベトルフェール 5mg/kg；Meiji Seika ファルマ株式会社，東京，日本）と生理食塩水を混合させることで作製した。

外科的介入法について，ACL-T モデル・DMM モデルは先行研究の方法に則り実施した²⁸⁾。ACL-T モデルは左膝関節前面を縦切開し，膝蓋腱内側から関節包内に侵入させた剪刀を用いて ACL を切断した。その後，関節包と皮膚を縫合糸で閉創した。DMM モデルに関して，膝関節前面を縦切開し，膝蓋腱内側から関節包内に侵入させた剪刀を用いて内側の脛骨半月靭帯を切断した。その後，内側半月板の不安定化を確認し，関節包と皮膚を縫合糸で閉創した。CATT・CATR モデルに関して，ACL-T・DMM モデルを作製し関節包を縫合後，25G の注射針

（Terumo Co, Ltd, JPN）を用いて大腿骨遠位と脛骨近位に骨孔を作製した（図 8-A,a）。その後，骨孔に 4-0 ナイロン糸（Akiyama Co, Ltd, JPN）を貫通させ（図 8-A,a），ループ状に緊縛（図 8-A,b）した。CATT モデルは ACL 切断による関節不安定性を抑制するため，ナイロン糸が ACL の走行に沿う形で骨孔を作製し，CATR モデルでは半月板不安定化による膝関節回旋方向の不安定性を抑制するため，骨孔の位置をより垂直になるように作製した（図 8-B）。ACL-T・DMM モデ

ルでは同様に骨孔を作製した後、ナイロン糸を緩く結んだ。Sham 群においては関節包の切開までを行い同様の手順で骨孔を作製し、ナイロン糸を緩く結んだ。

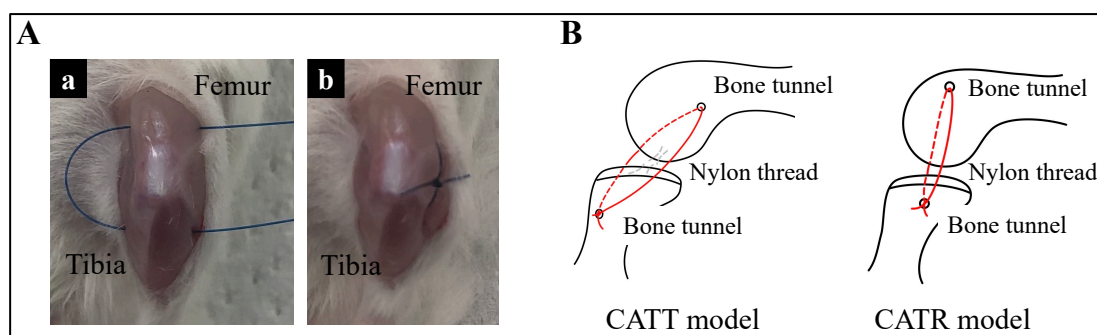


図 8. CATT・CATR モデルの作製方法

CATT・CATR モデルの作製方法. (A-a)大腿骨と脛骨に骨孔を作製. (A-b)ナイロン糸を貫通させループ状に緊縛した. (B)CATT モデルは ACL の走行に沿う形で骨孔を作製し, CATR モデルでは骨孔の位置をより垂直になるように作製した.

4.2.5. 組織採取

モデル作製から 4・6 週時点でマウスを頸椎脱臼法にて安楽死させた。その後、対象となる左後肢を採取した。採取後、関節不安定性の解析を実施し、4%Paraformaldehyde リン酸緩衝液にて 48 時間固定、マイクロ CT での骨形態計測までディープフリーザー (-80°C) 内で保管した。マイクロ CT での計測後、10%エチレンジアミン四酢酸溶液にて 3 週間脱灰処理を実施し、パラフィン置換によってパラフィンブロックを作成した。

4.2.6. 関節不安定性の評価

本研究では関節不安定性を剪断力として定義した。モデル間での関節不安定性の大きさを比較し、剪断力の増減を評価した。

4.2.6.1. 前後方向の関節不安定性の解析

脛骨前方引き出し装置と、軟 X 線装置 M-60 (Softex Co, Ltd, JPN) を用いて膝関節側面像を撮影した。撮影手順として、対象肢を採取し、大腿骨頭を切断、大腿骨近位 1/2 の大腿四頭筋、ハムストリングスをトリミングした後、脛骨前方引き出し装置に膝関節 90° 屈曲位で固定し、前方へ牽引しない状態で撮影した。その後、定性ばね (Sanko spring Co, Ltd, JPN) を用いて 0.05kgf の力で脛骨近位部を前方に牽引した状態でも撮影した。撮影条件は電圧 30kV、電流 1.5mA、露光時間 1 秒とし、画像はデジタル画像センサー NAOMI (RF Co, Ltd, JPN) によってデジタル化した。前後方向の関節不安定性は牽引していない状態から、牽引した際の脛骨の前方変位量として定義し、画像処理ソフトウェア Image J (U.S. National Institutes of Health, MD, USA) で定量化した。

4.2.6.2. 回旋方向の関節不安定性の解析

研究 1 と同様の手順で回旋方向の関節不安定性の評価を実施した。

4.2.7. 関節軟骨変性の組織学的解析

4.2.7.1. 組織標本作製

採取した膝関節から作成したパラフィンブロックをマイクロトーム ROM380 (Yamato Kohki Industrial Co, Ltd, JPN) にて矢状断切片 (6 μ m) を作成した。

4.2.7.2. 一般染色

関節軟骨変性を評価するために一般的に用いられる Safranin O Fast Green 染色を行った。染色した切片はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE CO, JPN) を用いて撮影し、研究 1 と同様に OARSI スコア³⁵⁾に基づいて解析を実施した。スコアリングはランダム化した組織像を 2 名の共同研究者が独立して採点し、2 名の評価者のスコアの平均値をスコアとした。

4.2.7.3. 免疫組織化学染色

初期の軟骨変性の特徴とされている軟骨細胞の肥大化を評価するために、肥大化軟骨細胞の特異的マーカーである Collagen type X の免疫組織化学染色を実施した。染色方法は研究 1 と同様に Avidin-Biotinylated enzyme Complex 法を用いて実施し、一次抗体を Rabbit Anti-Collagen X antibody (希釈濃度 1/300; ab58632; Abcam plc, JPN) とし 4°C にて一晩反応させた。解析は、ランダムに選択された関節軟骨領域 10000 (100×100) μm^2 における陽性細胞率を算出した。

4.2.8. マイクロ CT による解析

4.2.8.1. 内側半月板の巨視的観察

各モデルの内側半月板側方変位の評価として、マイクロ CT (Skyscan 1272, Bruker, MA, USA) を用いて対象組織のスキャンを行い、透過像を取得した。撮影条件は、X 線電圧 60kV, X 線電流 165 μA , フィルター AI 0.25mm, 角度ピッチ 0.7°, 平均化処理回数 2 回とし、ピクセルサイズ 6 μm で撮影した。その後 NRecon (Bruker, MA, USA) を用いて再構成を行い、再構成画像から内側半月板を巨視的に観察した。

4.2.8.2. マイクロ CT による骨構造変化の解析

軟骨下骨の骨形態学的解析のため、再構成した断面像に対して、画像解析ソフトウェア CTAn (Bruker, MA, USA) を用いて骨体積比 (Bone volume / Tissue volume ; BV/TV, %) を算出した。解析領域に関して、BV/TV は、水平面の断面像より内側脛骨の軟骨下骨に直径 1.2mm の正円を指定し、指定したスライドから 40 スライドを関心領域として指定した。

4.2.9. 軟骨下骨の組織学的解析

4.2.9.1. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色

TRAP 染色キット (Wako CO, Ltd, JPN) のプロトコルに従って TRAP 染色を行った。解析は、軟骨下骨骨髓領域において骨髓の骨表面における TRAP 染色陽性細胞で表される破骨細胞面 (Osteoclast surface / Bone surface ; Oc.S/BS, %) を算出した。

4.2.9.2. 免疫組織化学染色

軟骨下骨領域における骨芽細胞の活性を評価するために、骨芽細胞のマーカータンパク質である Osterix の免疫組織化学染色を avidin-Biotinylated enzyme Complex 法を用いて実施した。一次抗体を Rabbit Osterix polyclonal antibody (希釈濃度 1/250 ; bs-1110R ; Bioss, USA) とし 4°C にて一晩反応させた。解析は、ランダムに選択された 2 箇所 of 軟骨下骨骨髓領域 2500 (50×50) μm^2 における陽性細胞率を算出し、その平均値を解析に用いた。

4.2.10. 統計解析

全てのデータに対し Shapiro-Wilk 検定による正規性の検証を行った。関節不安定性の評価，OARSI スコアによる比較に対しては，Kruskal-Wallis 検定を使用した。その後，多重比較として Steel-Dwass 法を用いた。Collagen type X の陽性細胞率の比較，軟骨下骨に対する BV/TV，の比較，TRAP 染色による破骨細胞面の比較，Osterix 陽性細胞率の比較に対しては，一元配置分散分析を使用した。その後，多重比較として Tukey-Kramer 法を用いた。

統計解析には，統計解析ソフト R version3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用した。有意水準を 5%とした。

4.3. 結果

4.3.1. 関節不安定性の解析結果

4.3.1.1. 前後方向の関節不安定性の解析結果

前方引き出し試験の解析結果を図9に示した。4週時点において、ACL-T 群の関節不安定性は他の群と比較して有意に増大した (ACL-T vs. Sham, $p = .031$; ACL-T vs. CATT, $p = .032$; ACL-T vs. DMM, $p = .031$; ACL-T vs. CATR, $p = .031$)。CATT 群は ACL-T 群の関節不安定性を抑制したものの、他の群と比較して関節不安定性が有意に増大していた (CATT vs. Sham, $p = .032$; CATT vs. DMM, $p = .032$; CATT vs. CATR, $p = .032$)。6週時点でも同様に ACL-T 群の関節不安定性は他の群と比較して有意に増大し、CATT 群は ACL-T 群の関節不安定性を抑制した (ACL-T vs. Sham, $p = .047$; ACL-T vs. CATT, $p = .032$; ACL-T vs. DMM, $p = .032$; ACL-T vs. CATR, $p = .032$)。

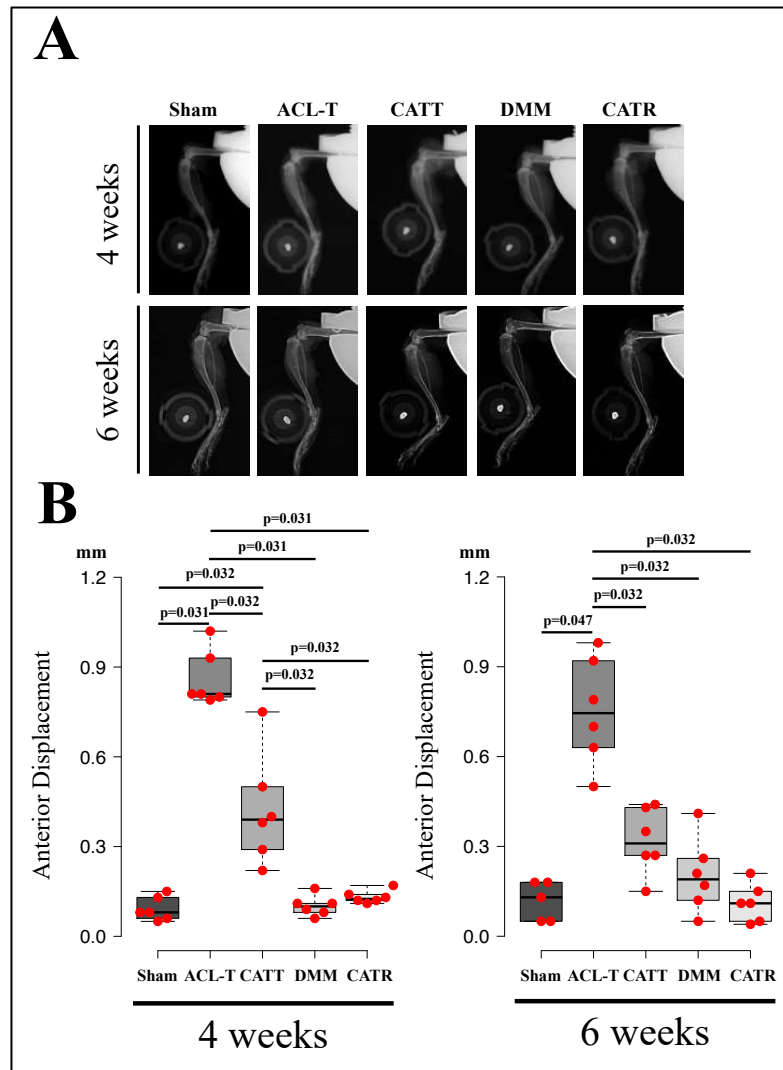


図 9. 前方引き出し試験による関節不安定性の評価

(A) 各群の前方引き出し時の撮影像. (B) 脛骨前方変位量の解析結果. ACL-T 群の前後方向の関節不安定性が他の群と比較して高値を示した. データは中央値[四分位範囲]で示す.

4.3.1.2. 回旋不安定性の解析結果

側方牽引装置による回旋方向の関節不安定性の解析結果を図 10 に示した。4 週時点では DMM 群の関節不安定性が ACL-T 群, CATT 群, CATR 群と比較して有意に増大し, CATR 群は DMM 群の関節不安定性を抑制した (DMM vs. ACL-T, $p = .032$; DMM vs. CATT, $p = .032$; DMM vs. CATR, $p = .032$)。6 週時点でも同様に DMM 群の関節不安定性が増大し, ACL-T 群, CATR 群と比較して有意に関節不安定性が増大した (DMM vs. ACL-T, $p = .032$; DMM vs. CATR, $p = .032$)。

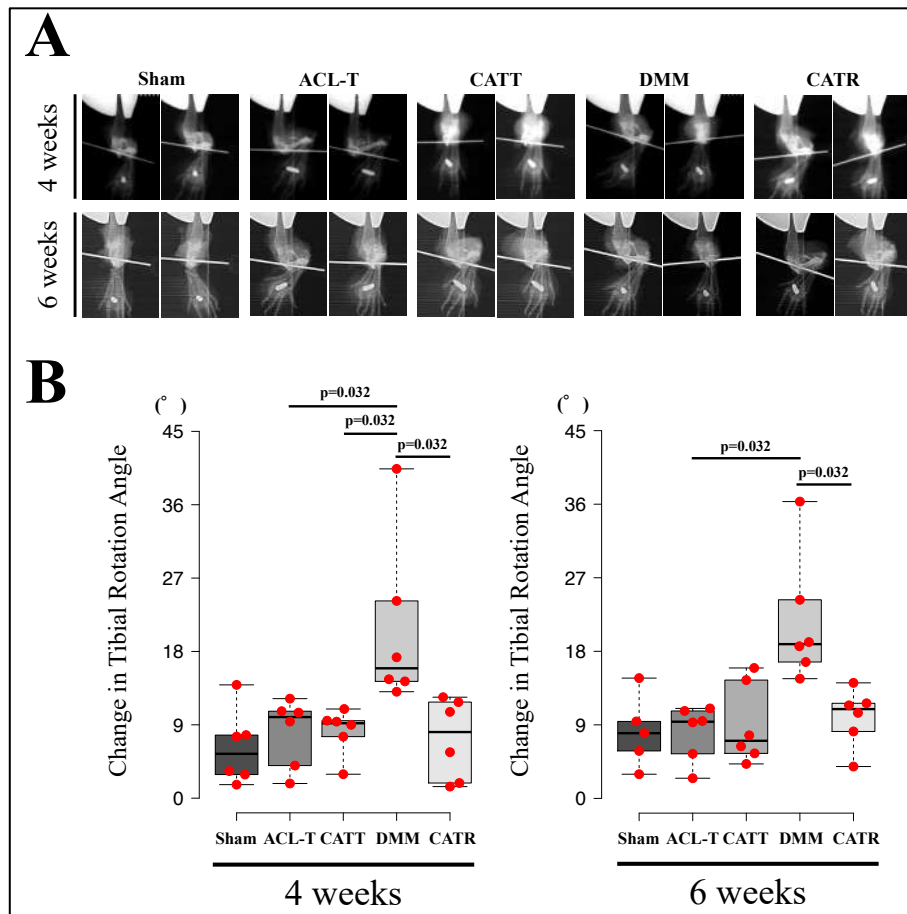


図 10. 側方牽引試験による関節不安定性の評価

(A) 各群の側方牽引時の撮影像。(B) 回旋角度変化量の解析結果。DMM 群の回旋方向の関節不安定性が他の群と比較して高値を示した。データは中央値[四分位範囲]で示す。

4.3.2. マイクロ CT による巨視的観察結果

マイクロ CT の 3D 再構成画像による巨視的観察像を図 11 に示した。内側半月板の位置を観察した結果，DMM 群と CATR 群では内側半月板の側方逸脱が全てのサンプルで観察された。しかし，他の群では全てのサンプルで内側半月板の側方逸脱はみられなかった。

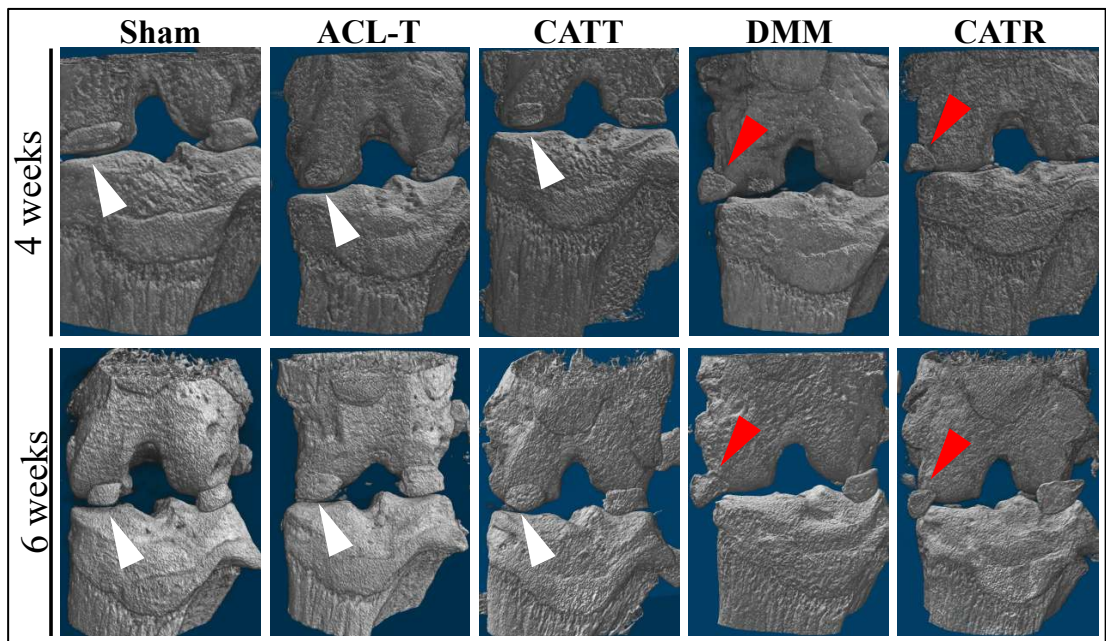


図 11. マイクロ CT による巨視的観察像

各群の 3D 再構成画像。DMM 群，CATR 群では内側半月板の側方逸脱が観察され(赤矢頭)，他の群では観察されなかった(白矢頭)。

4.3.3. 軟骨下骨骨構造変化の解析結果

軟骨下骨の骨構造解析結果を図 12 に示した。BV/TV の結果について、4 週時点における DMM 群の BV/TV が CATT 群と比較して有意に高値を示した (DMM vs. CATT, $p = .043$)。また、有意差は認めないが ACL-T 群と CATT 群の BV/TV は Sham 群と比較して低値を示し、DMM 群の BV/TV は Sham 群と比較して高値を示した。また、6 週時点での BV/TV は DMM 群、CATR 群が ACL-T 群、CATT 群と比較して有意に高値を示し (DMM vs. ACL-T, $p = .002$; DMM vs. CATT, $p = .014$; CATR vs. ACL-T, $p = .006$; CATR vs. CATT, $p = .048$)、有意差は認めないが ACL-T 群と CATT 群の BV/TV は Sham 群と比較して低値を示し、DMM 群と CATR 群の BV/TV は Sham 群と比較して高値を示した。

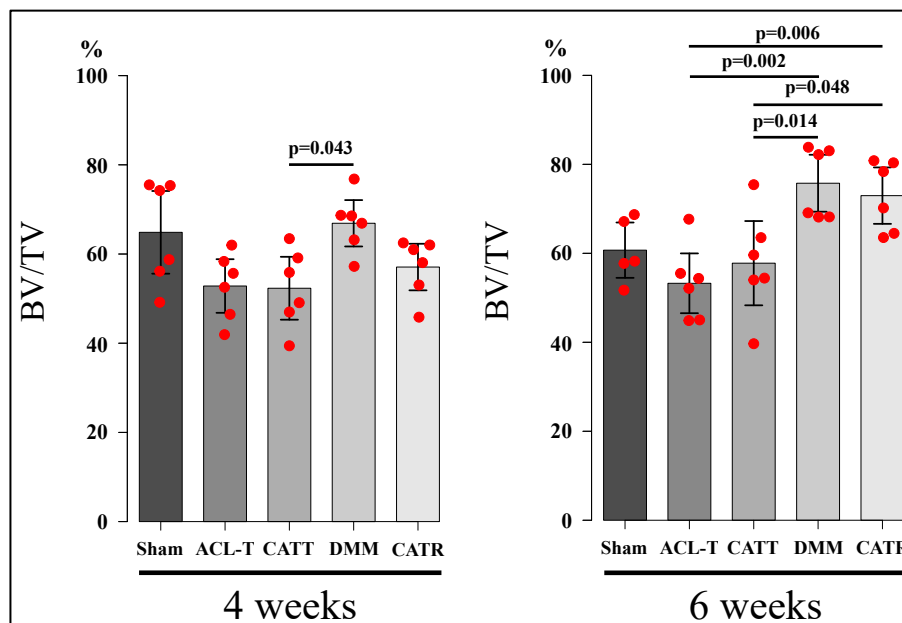


図 12. 軟骨下骨の骨構造解析結果

マイクロ CT による軟骨下骨の骨構造解析結果。4 週時点で DMM 群の BV/TV が CATT 群と比較して高値を示した。6 週時点では DMM 群と CATR 群の BV/TV が ACL-T 群と CATT 群と比較して高値を示した。データは平均値 \pm 95%CI で示す。

4.3.4. 関節軟骨変性の組織学的解析結果

Safranin O Fast Green 染色による染色像と OARSI スコアによる軟骨変性の解析結果を図 13 に示した。ACL-T 群では 4・6 週ともに表層の線維化や不整が確認されたが、各モデル間で OARSI スコアに有意差はみられなかった。

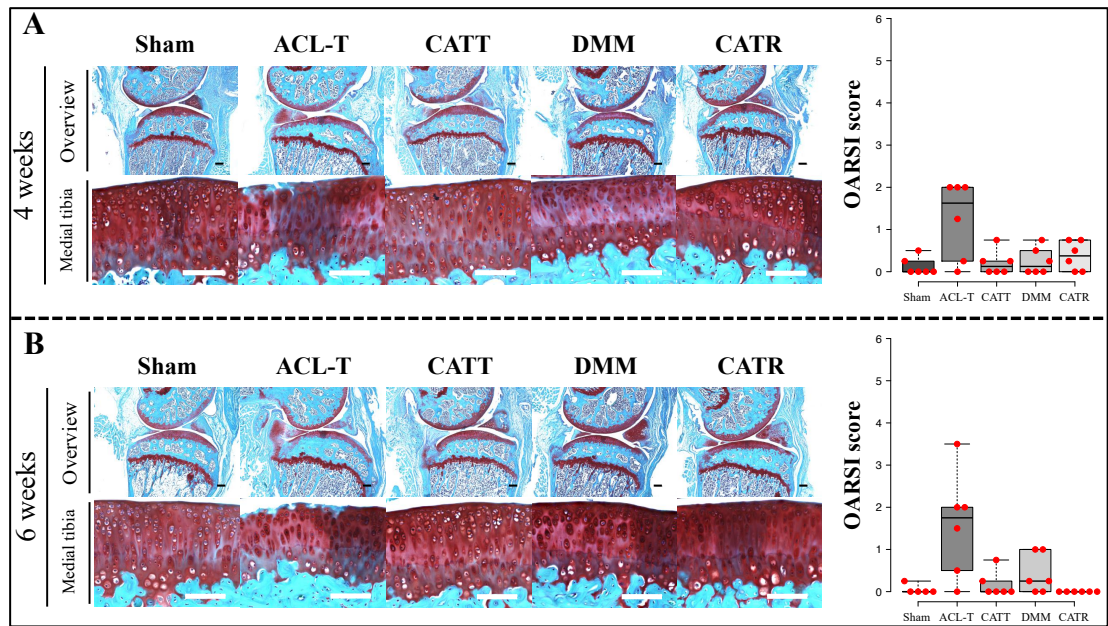


図 13. 関節軟骨変性の解析結果

(A)4 週時点の染色像と OARSI スコア。ACL-T 群では表層の関節軟骨変性が確認されたが、OARSI スコアに有意差はみられなかった。(B)6 週時点の染色像と OARSI スコア。4 週時点と同様に ACL-T 群では表層の関節軟骨変性が確認されたが、OARSI スコアに有意差はみられなかった。データは中央値[四分位範囲]で示す。

関節軟骨における Collagen type X の染色像と解析結果を図 14 に示した。4 週時点で、ACL-T 群、DMM 群の Collagen type X 陽性細胞率が Sham 群と比較して有意に高値を示した (ACL-T vs. Sham, $p < .001$; DMM vs. Sham, $p = .002$)。6 週時点でも同様に ACL-T 群、DMM 群の Collagen type X 陽性細胞率が Sham 群と比較して有意に高値を示した (ACL-T vs. Sham, $p = .002$; DMM vs. Sham, $p = .022$)。また、CATT 群と CATR 群の Collagen type X 陽性細胞率は ACL-T 群と DMM 群と比較して低値を示し、Sham 群と同程度であった。

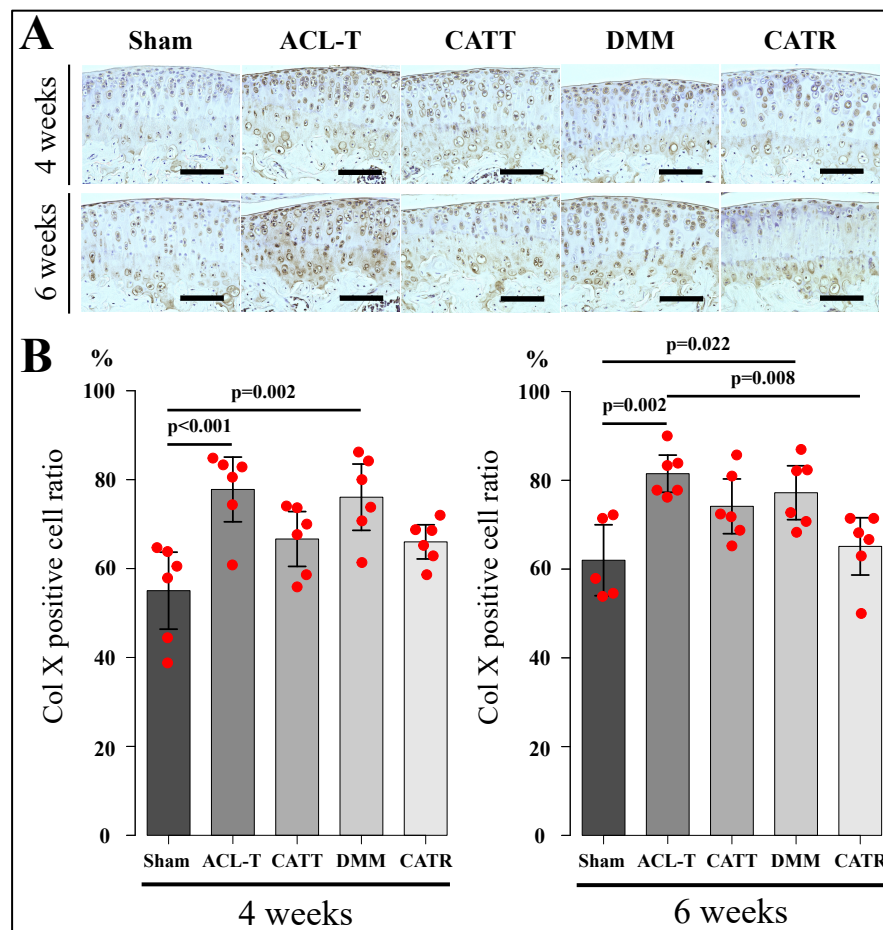


図 14. Collagen type X 免疫組織化学染色の解析結果

(A)各時点の代表的な染色像。(B) Collagen type X 陽性細胞率の解析結果。4 週、6 週ともに ACL-T 群と DMM 群の陽性細胞率が Sham 群と比較して高値を示した。データは平均値±95%CI で示す。

4.3.5. 軟骨下骨の組織学的解析結果

TRAP 染色による軟骨下骨骨髄領域における Oc.S/BS の解析結果を図 15 に示した. 4 週時点における ACL-T 群の Oc.S/BS は他の 4 群と比較して有意に高値を示した (ACL-T vs. Sham, $p < .001$; ACL-T vs. CATT, $p = .015$; ACL-T vs. DMM, $p = .001$; ACL-T vs. CATR, $p = .001$). 6 週時点では各群の Oc.S/BS に有意差は認めなかった.

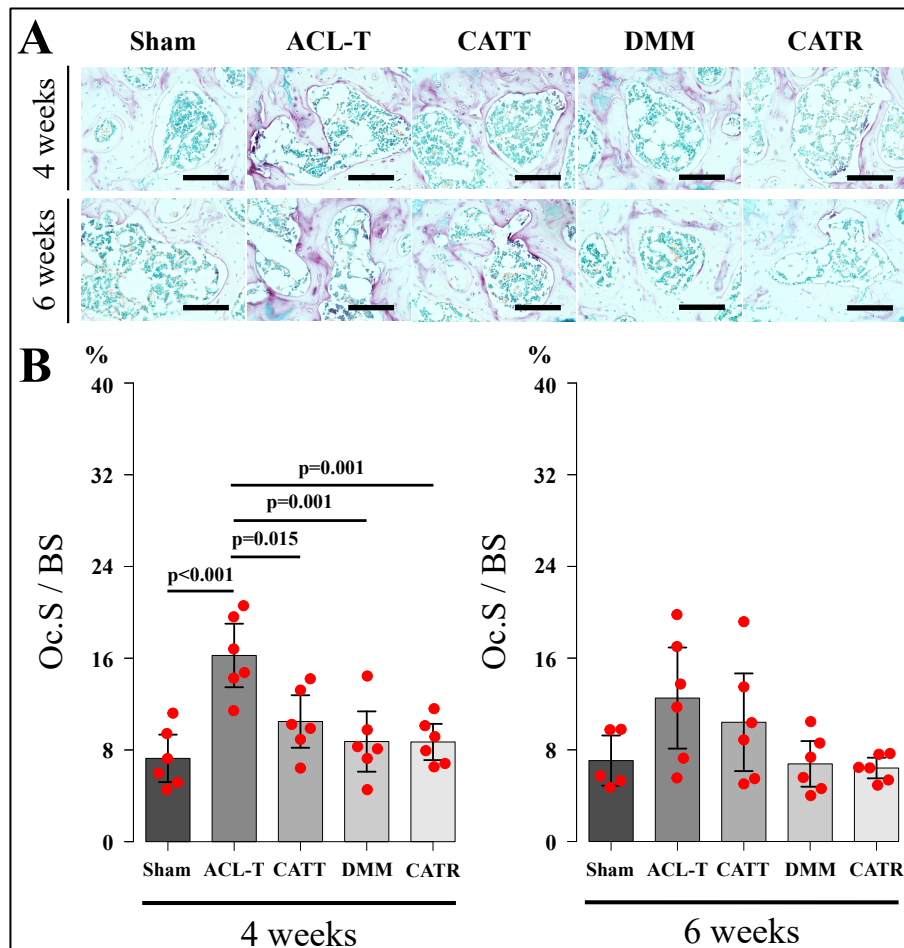


図 15. TRAP 染色の解析結果

(A)各時点の TRAP 染色像. (B) 各時点の Oc.S/BS の解析結果. 4 週時点における ACL-T 群の Oc.S/BS が他の群と比較して高値を示した. 6 週時点では各群間に差はみられなかった. データは平均値 \pm 95%CI で示す.

軟骨下骨における Osterix の染色像と解析結果を図 16 に示した。4 週時点における Osterix 陽性細胞率に関して、DMM 群は Sham 群と比較して有意に高値を示し(DMM vs. Sham, $p = .004$), CATR 群は Sham 群, ACL-T 群と比較して有意に高値を示した(CATR vs. Sham, $p = .001$; DMM vs. ACL-T, $p = .021$)。6 週時点では各群の Osterix 陽性細胞率に有意差は認めなかった。

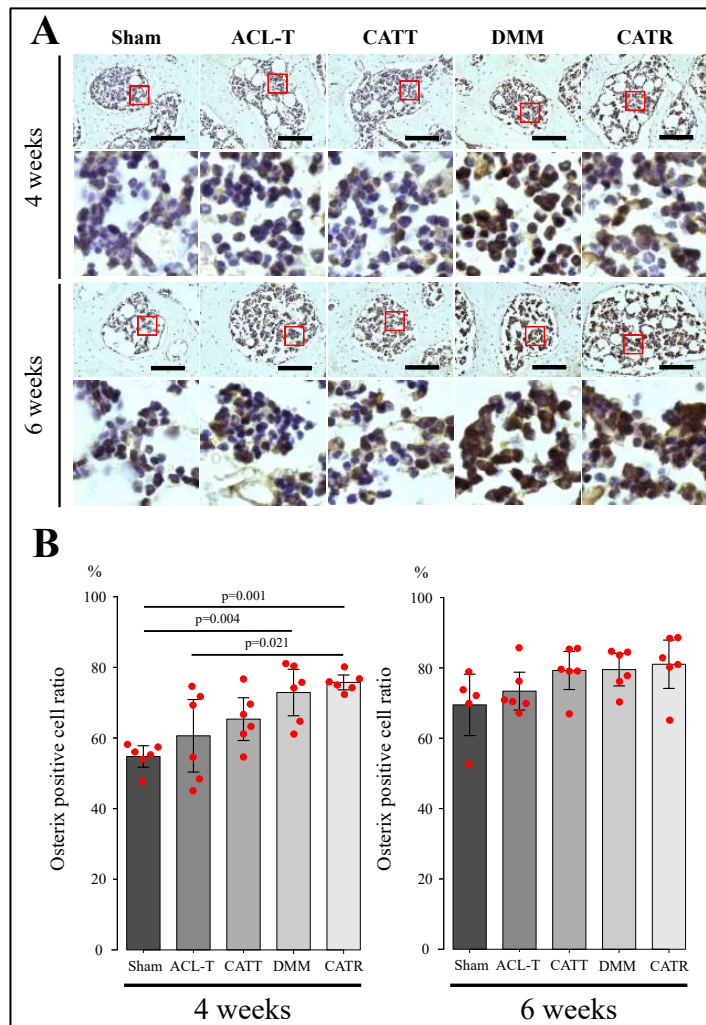


図 16. Osterix 免疫組織化学染色の解析結果

(A)各時点の代表的な Osterix 染色像。(B) Osterix 陽性細胞率の解析結果。4 週時点において DMM 群と CATR 群の陽性細胞率が Sham 群と比較して高値を示した。6 週時点では各群間に差はみられなかった。データは平均値±95%CI で示す。

4.4. 考察

本研究では、ACLと半月板の機能の違いに着目し、生体内での剪断力と圧縮応力の増減を再現したモデルの比較から、異なるメカニカルストレスが骨軟骨組織のメカノレスポンス機構に与える影響を検証した。

関節不安定性の解析結果から、CATT群はACL-T群で生じる関節不安定性を抑制し、CATR群はDMM群で生じる関節不安定性を抑制した。さらに、DMM群とCATR群では内側半月板の側方逸脱が確認され、研究1において半月板変性も同程度認めた。これらの結果から、ACL-T群とDMM群では関節不安定性による剪断力の増大が生じ、CATT群、CATR群は剪断力を軽減させるモデルであること。そしてDMM群とCATR群では半月板機能不全による圧縮応力が増大するモデルであることが示唆された(図17)。

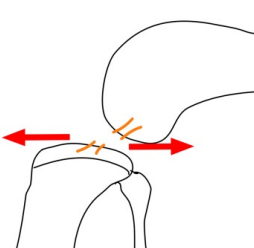
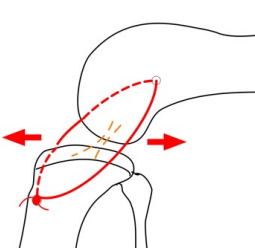
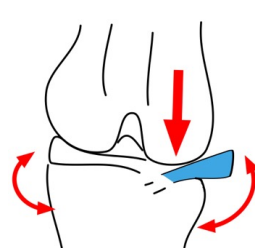
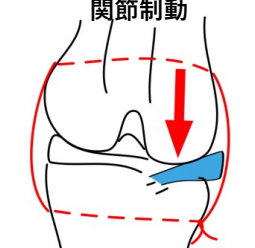
ACL-Tモデル	CATTモデル	DMMモデル	CATRモデル
ACL切断	ACL切断+関節制動	半月板機能不全	半月板機能不全 + 関節制動
			
剪断力：増大	剪断力：軽減	剪断力・圧縮応力：増大	圧縮応力：増大

図 17. メカニカルストレスの異なるモデルの確立

ACLと半月板の機能の違いに着目し、生体内でのメカニカルストレスの異なるモデルを確立した。

モデル間の関節軟骨変性の比較について、これまでにACL-TモデルはDMM群と比較して関節不安定性が大きく、軟骨変性が急速に進行することが報告されている^{28,47)}。本研究では外科的介入から4・6週時点

で ACL-T 群のみ表層の関節軟骨変性が確認されたが、OARSI スコアによる比較では有意差を認めなかった。本研究では介入から早期の時点の骨軟骨組織のメカノレスポンス機構を評価した。そのため、OARSI スコアに検出されるような重度の軟骨変性は確認されなかったことが考えられる。しかし、初期変性の特徴である軟骨細胞肥大化を Collagen type X の免疫組織化学染色で評価した結果、剪断力が増大した ACL-T 群と DMM 群の Collagen type X 陽性細胞率が Sham 群と比較して有意に増加していた。一方で、剪断力を軽減させた CATT 群、CATR 群の Collagen type X 陽性細胞率は Sham 群と同程度であった。これらから、研究 1 の結果と同様に、関節軟骨変性には剪断力の増大が強く関与することが示唆された。

軟骨下骨の変化は骨軟骨組織の変性に重要であり、軟骨下骨の異常なリモデリングは OA の発症・進行に不可欠である^{48,49)}。これまでに、ACL-T モデルでは軟骨下骨の骨喪失が生じることが明らかになっている⁴⁹⁾。一方で、DMM モデルでは早期に BV/TV が増大することが報告されており⁵⁰⁾、モデル間でのコンセンサスが得られていない。興味深いことに、本研究では関節不安定性の抑制による剪断力の軽減は軟骨変性に対して抑制的に作用したが、軟骨下骨には影響しなかった。具体的に、軟骨下骨の骨構造変化は、ACL を切断した ACL-T 群と CATT 群、半月板機能不全が生じる DMM 群と CATR 群で異なる変化が観察された。ACL-T 群と CATT 群では BV/TV 低下が確認された。これまでに後肢懸垂による荷重負荷の減少は BV/TV の減少を引き起こすことが明らかになっている⁴⁸⁾。関節不安定性の解析から、ACL-T 群に加え、CATT 群は前後方向の関節不安定性が増大した。したがって、これらの群では ACL 切断による関節不安定性が生じ、接触領域が分散することで荷重による

圧縮応力の減少を招き、Oc.S/BS の増加を伴う破骨細胞による骨吸収が促進され、BV/TV の低下が生じたことが推察される。対照的に、DMM 群と CATR 群では BV/TV が増加した。これまでに、脛骨に対する軸方向の圧縮負荷は BV/TV を増加させることが報告されている^{51,52)}。DMM 群、CATR 群では内側半月板の側方逸脱に加え、研究 1 では半月板の変性も確認された。したがって、これらの群では半月板機能不全によって関節面への圧縮応力増大が生じ、BV/TV の増加を引き起こした可能性が考えられる。また、骨芽細胞前駆体の Osterix 陽性細胞率も DMM 群、CATR 群で高値を示した。よって、関節面への圧縮応力の増大は、骨芽細胞の分化を促進し、骨形成に寄与することが推察された。

本研究結果をまとめると、関節不安定性の抑制による剪断力の軽減は、軟骨細胞の肥大化を抑制することで軟骨変性を抑制することが示唆された。一方で、軟骨下骨の変化は ACL を切断したモデルと半月板機能不全が生じるモデルで異なる変化を示した。異なる変化を示した要因に ACL と半月板の機能の違いが考えられる。ACL の主な機能は膝関節に対する剪断力に抵抗することであり、半月板の主な機能は膝関節への圧縮応力の分散である。したがって、ACL の機能不全は剪断力の増大を引き起こし、半月板の機能不全は圧縮応力の増大を引き起こすことが推察される。よって、軟骨下骨の異なる変化は関節に加わるメカニカルストレスの種類の違いが引き起こす可能性が示唆された。

本研究の限界として、メカニカルストレスの種類、強度を定量化できていない点、変性初期の変化のみを解析している点が挙げられる。今後の研究では、より長期のタイムポイントの検証を実施するとともに、*in vitro* および *ex vivo* の実験でストレスの質の定量、各ストレスに対する骨軟骨組織のメカノレスポンスを評価していく必要がある。

5. 研究 3 ; 異なるモデルにおける部位特異的な軟骨下骨の変化の違い

5.1. 目的

一般に、膝 OA 進行過程における軟骨下骨の変化として、軟骨下骨の異常なリモデリングによって初期に骨吸収が促進され、後期には骨形成が生じることが報告されている。しかし、半月板機能不全モデルである DMM モデルでは早期に軟骨下骨の骨体積比が増大するといった報告も散見され⁵⁰⁾、未だコンセンサスは得られていない。この点に対して、我々はメカニカルストレスの異なるモデルを用いて、脛骨内側領域における早期の軟骨下骨のリモデリングの変化を解析した。その結果、メカニカルストレスの種類が軟骨下骨に異なる影響を与え、関節不安定性による剪断力の増大は骨吸収を促進し、圧縮応力の増大は骨形成を促進することが明らかとなった(発表論文 2)。しかし、研究 2 での解析は脛骨内側領域全体の特徴である。これまでに膝関節の関節面において半月板で覆われた領域と覆われていない領域では関節軟骨の機械的特性が異なることが示されている⁵³⁾。半月板は、圧縮応力の分散が主たる機能であり⁵⁴⁾、半月板の機能不全は軟骨を通して軟骨下骨に伝わるメカニカルストレスに影響を与え得る。よって、脛骨軟骨下骨の変化は半月板機能や、領域毎に受けるメカニカルストレスによって異なるのではないかと仮説した。

以上より、メカニカルストレスの異なるモデルにおける領域毎の脛骨軟骨下骨の変化の違いを検証し、異なるメカニカルストレスに対する軟骨下骨の異なるメカノレスポンス機構の解明を目的とした。

5.2. 方法

5.2.1. 倫理的配慮

本学研究倫理審査委員会の承認後（承認番号 2020-1），動物実験基本計画書ならびに実施計画書に従い研究を実施した．実験動物に対し，外科的介入への疼痛軽減措置を実施した．

5.2.2. 研究デザイン

ICR 系雄性マウス 12 週齢 40 匹を対象とした．対象を，ACL を切断することで剪断力を増大させた ACL-T 群，ACL-T モデルの関節不安定性を抑制することで剪断力を軽減させた CATT 群，半月板機能不全による関節不安定性と圧縮応力増大が生じる DMM 群，DMM モデルの関節不安定性を抑制することで剪断力のみを軽減させた CATR 群，Sham 群の計 5 群に割り当てた（図 18）．対象組織を左後肢の膝関節とし，モデル作製から 4 週及び 6 週時点で膝関節を採取し，半月板の組織学的解析，マイクロ CT による骨形態学的解析を実施した．

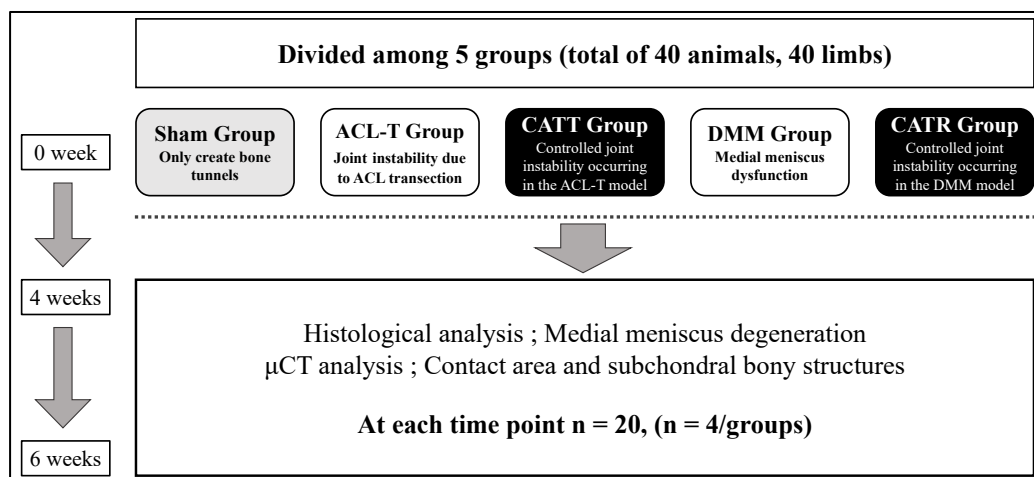


図 18. 研究デザイン

対象を ACL-T 群，CATT 群，DMM 群，CATR 群，Sham 群の 5 群に分類した．外科的介入から 4・6 週時点で組織を採取し，CT による骨形態学的解析と組織学的解析を実施した．

5.2.3. 飼育方法

マウスはポリカーボネート製ゲージの中で飼育した。水や飼料には自由にアクセスできるようにした。飼育室の環境は室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $55\pm 5\%$ ，12 時間サイクルで明暗とした。

5.2.4. 実験モデル作製

研究 2 と同様の手順で各モデルを作製した。

5.2.5. 組織採取

モデル作製から 4・6 週時点でマウスを頸椎脱臼法にて安楽死させた。その後，対象となる左後肢を採取した。採取後，4%Paraformaldehyde リン酸緩衝液にて 48 時間固定し，マイクロ CT での骨形態計測までディープフリーザー (-80°C) 内で保管した。マイクロ CT での計測後，10% エチレンジアミン四酢酸溶液にて 3 週間脱灰処理を実施し，パラフィン置換によってパラフィンプロックを作成した。

5.2.6. 半月板の組織学的解析

5.2.6.1. 組織標本作製

対象のパラフィンプロックをマイクロトーム ROM380 (Yamato Kohki Industrial Co, Ltd, JPN) を用いて薄切し，矢状断切片 ($6\mu\text{m}$) を作成した。

5.2.6.2. 半月板変性のスコアリング

半月板変性の重症度を評価するために，Safranin O Fast Green 染色を行った。その後，オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE CO,

JPN) を用いて切片を撮影し、Kwok らの報告³⁶⁾をもとに、スコアリングによる半月板変性の重症度を評価した。スコアリングはランダム化した組織像を 1 名の共同研究者が独立して採点を行った。

5.2.7. 軟骨下骨の骨形態学的解析

5.2.7.1. マイクロ CT による骨形態の計測

軟骨下骨の骨形態学的解析のため、マイクロ CT (Skyscan 1272, Bruker, MA, USA) を用いて対象組織のスキャンを行い、透過像を取得した。撮影条件は、X 線電圧 60kV, X 線電流 165 μ A, フィルター AI 0.25mm, 角度ピッチ 0.7° , 平均化処理回数 2 回とし、ピクセルサイズ 6 μ m で撮影した。取得した透過像を再構成用のソフトウェア NRecon (Bruker, MA, USA) を用いて再構成を行った。

5.2.7.2. 再構成画像の巨視的観察

再構成画像から矢状面と前額面上の関節面画像を取得し、各群のコンタクトエリア、半月板の側方逸脱の有無を評価した。

5.2.7.3. 骨形態学的解析

軟骨下骨の骨形態学的解析として、再構成した断面像に対して、画像解析ソフトウェア CTAn (Bruker, MA, USA) を用いて骨体積比 (Bone volume/Tissue volume ; BV/TV, %) を算出した。

解析領域に関して、BV/TV は、水平面の断面像より脛骨関節面を内外側・前後方の 4 領域に分割し、各領域を前内側(Medial Anterior ; MA)領域、後内側(Medial Posterior ; MP)領域、前外側(Lateral Anterior ; LA)領域、後外側(Lateral Posterior ; LP)領域とした。各領域に直径

0.7mm の正円を指定し，指定したスライドから 40 スライドを関心領域として指定した(図 19).

各領域の骨体積を算出後，同一モデル内での比較と，同一領域でのモデル間での比較を実施した.

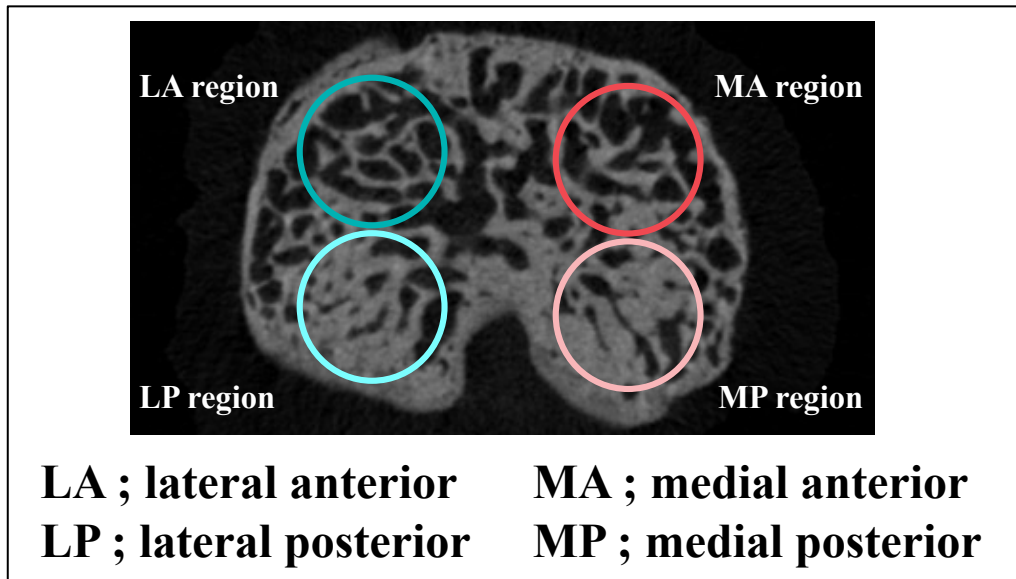


図 19. 軟骨下骨の解析領域

CATT・脛骨軟骨下骨の関心領域を前内側(medial anterior ; MA)領域，後内側(medial posterior ; MP)領域，前外側(lateral anterior ; LA)領域，後外側(lateral posterior ; LP)領域の 4 領域に設定した.

5.2.8. 統計解析

全てのデータに対し Shapiro-Wilk 検定による正規性の検証を行った. 半月板変性スコアの比較に対しては，Kruskal-Wallis 検定を使用した. その後，多重比較として Steel-Dwass 法を用いた. 骨体積比の比較に対しては，一元配置分散分析を使用した. その後，多重比較として Tukey-Kramer 法を用いた. 統計解析には，統計解析ソフト R version3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用した. 有意水準を 5%とした.

5.3. 結果

5.3.1. 半月板変性のスコアリングによる解析結果

半月板の染色像とスコアリングによる解析結果を図 20 に示した。4・6 週時点の前節・後節ともに Sham 群以外の全ての群で半月板の変性が確認され、特に DMM 群、CATR 群では前節の半月板変性が顕著にみられた。しかし、各時点でのスコアリングに有意差はみられなかった。

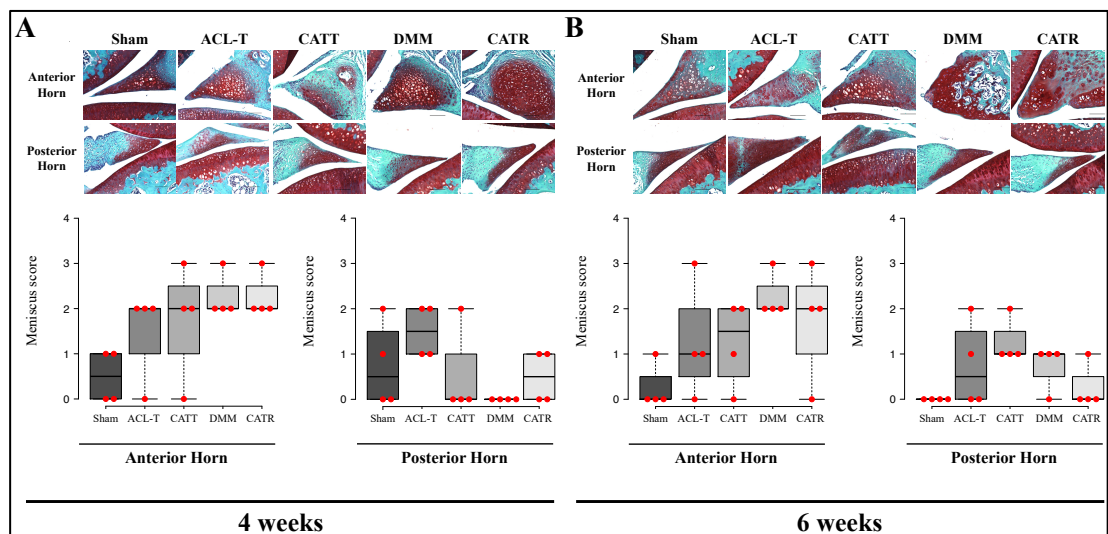


図 20. 半月板変性のスコアリングによる比較

(A) 4 週時点における各群の Safranin O Fast Green 染色像と、スコアリングの解析結果。前節・後節共にスコアリングに有意差はみられなかった。(B) 6 週時点における各群の Safranin O Fast Green 染色像と、スコアリングの解析結果。前節・後節共にスコアリングに有意差はみられなかった。データは中央値[四分位範囲]で示す。

5.3.2. マイクロ CT 再構成画像による巨視的観察結果

各群の再構成画像による矢状面および前額面の巨視的観察結果を図 6 に示した。矢状面上では、ACL-T 群の接触面積は他の群に比べ後方に変位していた。前頭面では、接触面積に特徴的な差はみられなかったが、DMM 群と CATR 群の内側半月板側方逸脱が認められた(図 21 白矢印)。

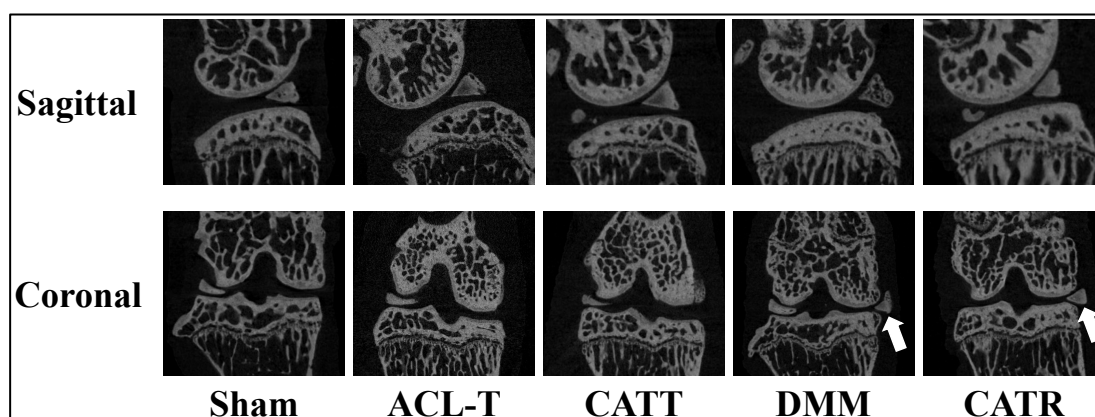


図 21. 再構成画像による巨視的観察

各群の再構成画像. 矢状面画像では, ACL-T 群で接触領域の後方化が確認された. 前額面上では DMM 群, CATR 群で内側半月板の側方逸脱が認められた.

5.3.3. 同一モデルにおける領域間の骨体積比の解析結果

同一モデルの領域毎の骨体積比の解析結果を図 22 に示した. Sham 群では 4 週時点では有意差はなく, 6 週時点において MP・LP 領域と比較して LA 領域が有意に低値を示した (LA vs. MP, $p = .010$; LA vs. LP, $p = .009$).

ACL-T 群では, 4 週時点において MP 領域が MA・LA 領域と比較して有意に高値を示した (MP vs. MA, $p = 0.002$; MP vs. LA, $p < 0.001$). 6 週時点では, MP 領域が LA 領域と比較して有意に高値を示した (MP vs. LA, $p = 0.036$).

CATT 群では, 4 週時点において MP 領域が MA・LA 領域と比較して有意に高値を示した (MP vs. MA, $p = 0.008$; MP vs. LA, $p = 0.001$). 6 週時点でも同様に MP 領域が MA・LA 領域と比較して有意に高値を示した (MP vs. MA, $p = 0.045$; MP vs. LA, $p = 0.003$).

DMM 群では、4 週時点において MP 領域が他の領域と比較して有意に高値を示した(MP vs. MA, $p = 0.009$; MP vs. LA, $p < 0.001$; MP vs. LP, $p = 0.001$). 6 週時点では MA・MP 領域が LA・LP の領域と比較して有意に高値を示し(MA vs. LA, $p < 0.001$; MA vs. LP, $p < 0.001$; MP vs. LA, $p < 0.001$; MP vs. LP, $p < 0.001$), LA 領域が LP 領域と比較して有意に低値を示した(LA vs. LP, $p = 0.005$).

CATR 群では、4 週時点において MP 領域が LA・LP 領域と比較して有意に高値を示し(MP vs. LA, $p < 0.001$; MP vs. LP, $p = 0.014$), MA 領域が LA 領域と比較して有意に高値を示した(MA vs. LA, $p = 0.018$). 6 週時点では, LA 領域が MP 領域と比較して有意に低値を示した(LA vs. MP, $p = 0.001$)

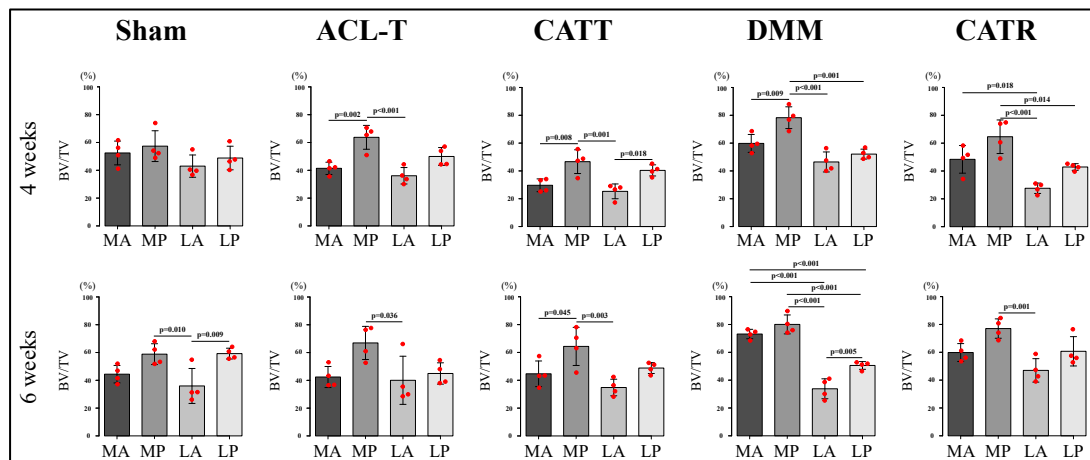


図 22. 領域毎の軟骨下骨骨構造変化の比較

各群における領域毎の BV/TV の解析結果. 4 週時点において ACL-T 群, CATT 群では MP 領域が高値を示した. 一方, DMM 群と CATR 群では MP 領域に加え, MA 領域も高値を示した. 6 週時点においても同様の傾向がみられた. データは平均値±95%CI で示す.

5.3.4. 同一領域におけるモデル間の骨体積比の解析結果

同一領域におけるモデル間の骨体積比の解析結果を図 23 に示した。MA 領域では 4 週時点において ACL-T 群は DMM 群と比較して有意に低値を示し(ACL-T vs. DMM, $p = 0.020$), CATT 群は Sham 群, DMM 群, CATR 群と比較して有意に低値を示した(CATT vs. Sham, $p = 0.004$; CATT vs. DMM, $p < 0.001$; CATT vs. CATR, $p = 0.017$)。6 週時点では, DMM 群は Sham 群, ACL-T 群, CATT 群と比較して有意に高値を示し(DMM vs. Sham, $p < 0.001$; DMM vs. ACL-T, $p < 0.001$; DMM vs. CATT, $p < 0.001$), CATR 群は Sham 群, ACL-T 群と比較して有意に高値を示した(CATR vs. Sham, $p = 0.047$; CATR vs. ACL-T, $p = 0.022$)。

MP 領域では, 4 週時点において DMM 群が CATT 群と比較して有意に高値を示した(DMM vs. CATT, $p = 0.003$)。6 週時点では, 各群間で有意差はみられなかった。

LA 領域では, 4 週時点において CATT 群が Sham 群, DMM 群と比較して有意に低値を示し(CATT vs. Sham, $p = 0.010$; CATT vs. DMM, $p = 0.002$), CATR 群が Sham 群, DMM 群と比較して有意に低値を示した(CATR vs. Sham, $p = 0.026$; CATR vs. DMM, $p = 0.006$)。6 週時点では, 各群間で有意差はみられなかった。

LP 領域では, 4 週時点において各群間での有意差はみられなかった。6 週時点では, CATR 群が ACL-T 群と比較して有意に高値を示した(CATR vs. ACL-T, $p = 0.022$)。

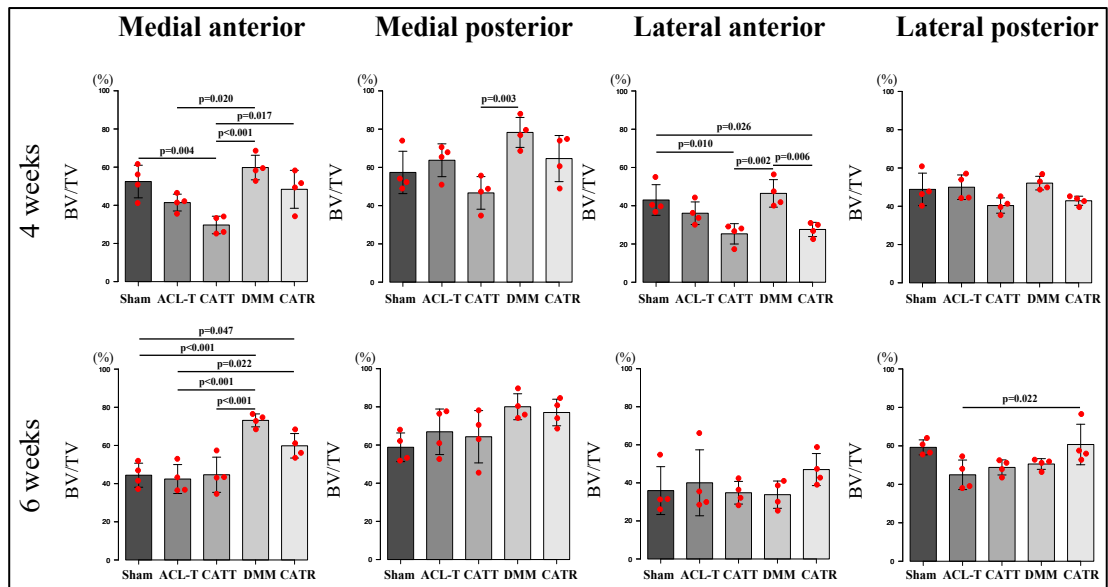


図 23. モデル間での軟骨下骨骨構造変化の比較

各領域における各群の BV/TV の解析結果. 特徴的な変化として, MA 領域では 4 週時点において, ACL-T 群, CATT 群が低値を示し, 6 週時点には DMM 群, CATR 群が高値を示した. データは平均値 ± 95%CI で示す.

5.4. 考察

研究 3 では, メカニカルストレスの異なるモデルにおける半月板の変性と, 領域毎の脛骨軟骨下骨の変化の違いを検証した. 半月板変性は, 動物モデルでみられる特徴の一つであり, Sham 群を除く全てのモデルで半月板変性が確認された. しかし, モデル間に有意差はみられなかった. マイクロ CT による解析結果から, モデルによって BV/TV の増減が異なる特徴がみられた. 再構成画像による観察結果を踏まえると, 脛骨軟骨下骨の領域毎におけるメカノレスポンスの特徴は, ACL や半月板の機能不全による接触領域の変化が影響している可能性が示唆された. 特に, 接触領域の変化により接触圧による圧縮応力が集中する部位では BV/TV が増大する傾向がみられ, 反対に接触圧が減少する部位では BV/TV が減少傾向であった. この結果から各部位に加わる圧縮応力が軟

骨下骨のメカノレスポンス機構に寄与することが明らかとなった。

これまでの報告で、半月板の変性は関節軟骨変性の危険因子とされており、半月板変性が軟骨変性の進行に関与することが明らかになっている⁵⁵⁻⁵⁸⁾。しかし、軟骨下骨の変化に対する半月板変性のもたらす影響は未解明である。本研究結果では Sham 群を除く全ての群で半月板の変性が認められた。しかし、各群の半月板変性スコアに有意差は認めなかった。我々の以前の報告では DMM モデルと CATR モデルの半月板変性はモデル作製から 8 週間後に確認されたが、対照群と半月板変性スコアに有意差はみられず、12 週間後に統計的な有意差が認められた⁵⁹⁾。本研究はモデル作製から 4・6 週間後の組織を解析しており、タイムポイントが早期であったため、半月板変性にモデル間の差がみられなかった可能性がある。

本研究では、マイクロ CT を用いた再構成画像の観察から接触領域の変化の評価を行なった。その結果、ACL-T 群では接触領域が後方にシフトしている特徴がみられた。ACL は膝関節における脛骨の前方偏位を抑制しており、ACL を切断した ACL-T 群では ACL 機能不全によって、脛骨前方変位が生じ接触領域が変化することが示唆された。CATT 群では、ACL-T 群でみられた程の接触領域の後方変位は認めなかった。しかし、我々の研究成果から CATT モデルは ACL-T モデルの関節不安定性を軽減させるが、対照群と比較して前後方向の関節不安定性が増大することが明らかとなっている⁶⁰⁾。従って、CATT 群においても接触領域の後方化が生じる可能性が推察される。一方、DMM 群と CATR 群では、矢状面上の接触領域の変化はみられなかったが、前額面上で内側半月板の側方逸脱が確認された。どちらのモデルも内側半月板と脛骨を繋ぐ内側脛骨半月靭帯を切断し、内側半月板の不安定化が生じるモデルである^{28,59)}。

また、DMM モデルは ACL-T モデルと比較して関節不安定性が小さいことも報告されている⁴⁷⁾。よって、関節不安定性による接触領域の変化よりも、内側半月板の側方逸脱による脛骨内側領域への圧縮応力の増大が生じることが推察される。

関節軟骨や軟骨下骨の機械的な特性は部位によって異なることが報告されている^{53,61-63)}。よって、軟骨下骨は部位毎の力学的環境によって異なるメカノレスポンスを示す可能性がある。本研究ではモデルによって軟骨下骨の変化が領域毎に異なることを明らかにした。ACL-T 群では、4 週時点の MP 領域の BV/TV が MA・LA 領域よりも高値を示し、6 週時点でも MP 領域の BV/TV が他の領域より高値を示す傾向がみられた。ACL-T モデルは MP 領域に軟骨変性が生じることが報告されている⁴⁶⁾。また、ACL-T モデルでは脛骨の前方変位が生じることが明らかであり^{38,39,60)}、本研究結果でも ACL-T 群は接触領域の後方化がみられた。したがって、ACL 切断後の接触領域の変化に伴う MP 領域における圧縮応力の増大が、MP 領域の BV/TV の増大を引き起こしたことが示唆された。

CATT 群では、ACL-T 群と同様に 4 週時点では MP 領域の BV/TV が MA 領域や LA 領域よりも高値であり、6 週時点においても MP 領域の BV/TV は MA 領域や LA 領域よりも高値を示した。CATT モデルは ACL-T モデルの関節不安定性を抑制するモデルであるが、軽度の前後方向の不安定性は残存する⁶⁰⁾。したがって、CATT 群でみられた軟骨下骨の変化は、関節不安定性による接触領域の変化が関連している可能性が示唆された。

DMM 群では、4 週時点で MP 領域の BV/TV は他の領域よりも高値を示し、6 週時点では MP・MA 領域の BV/TV が高い傾向にあった。これまでの研究で、DMM モデルにおける軟骨変性は、圧縮応力の増加と関

節の不安定性が原因である可能性が報告されている^{47,64,65}). 本研究から, DMM 群では内側半月板の逸脱が観察された. これらより, 内側領域における軟骨下骨の BV/TV の増大は, 半月板逸脱に伴う圧縮応力の増大による影響が関与することが示唆された.

CATR 群では, 4 週時点における MA・MP 領域の BV/TV が高値を示す特徴がみられた. CATR モデルは DMM モデルの関節不安定性を抑制したモデルである^{59,60}). 本研究結果から, CATR 群と DMM 群は同程度の半月板変性と半月板側方逸脱を認めた. さらに, 我々の過去の報告においても CATR モデルと DMM モデルの長期間の比較においても同程度の半月板編成を認めた⁵⁹). 従って, CATR 群における MA・MP 領域の BV/TV の増大は内側領域への圧縮応力の増大が引き起こした可能性が示唆された.

これまでの研究を通して, メカニカルストレスの異なるモデルの軟骨下骨の変化が異なることを明らかにした⁶⁰). しかし, 領域毎の特徴の違いは未解明であり, 領域毎にモデル間での比較を実施した.

MA 領域では, 4 週時点において CATT 群の BV/TV は ACL-T 群を除く他の群に比べ低値を示し, 6 週時点では, DMM 群と CATR 群の BV/TV は他の群に比べ高値を示した. CATT 群の BV/TV 低下は以前の我々の報告と一致している⁶⁰). さらに 4 週時点において, ACL-T 群は DMM 群と比較して BV/TV が低値であり, CATT 群と同程度であった. これらから ACL-T 群と CATT 群は ACL 切断後の接触領域の変化による MA 領域への圧縮応力の減少が BV/TV を引き起こした可能性が考えられる. 一方, DMM 群と CATR 群はともに内側半月板の側方逸脱が確認されている. 半月板の機能不全が圧縮応力の増大を引き起こすことがこれまでに明らかになっている^{64,65}). したがって, DMM 群と CATR 群の BV/TV

には半月板機能不全による圧縮応力の増大が関与することが示唆された。

一方、外側領域では LA 領域において CATT 群と CATR 群の BV/TV は、Sham 群と比較して低値を示し、LP 領域においても同様の傾向が認められた。CATT 群と CATR 群はともに関節不安定性を抑制したモデルである。これまでの報告で、CATT 群と CATR 群の作製による関節可動域制限は生じないことを確認している⁶⁰⁾。しかし、動的な可動域の測定はできておらず、関節不安定性を抑制する外科的介入が可動域や接触領域に変化を及ぼし、外側領域への圧縮応力減少を引き起こしている可能性がある。

本研究の限界としては以下の 2 点が挙げられる。まず、本研究はモデル作製から早期の段階での半月板と軟骨下骨の変化を解析した。よって、より長期間の変化を解析する必要がある。また、CATT・CATR モデルが関節運動に及ぼす影響は不明である。我々はこれまでに CATT・CATR モデルに可動域制限が生じないことを確認している。しかし、飼育中の歩行など、運動時の評価は実施できていない。そのため、関節不安定性の抑制が動作中の関節運動に与える影響を明らかにする必要がある。

以上をまとめると、本研究では、脛骨軟骨下骨のメカニカルストレスに対する領域毎のメカノレスポンスが異なることが明らかになった。特に、軟骨下骨の変化には ACL 切断や半月板機能不全による接触領域の変化に伴う圧縮応力の変化が影響し、圧縮応力の増大は BV/TV の増大に寄与し、圧縮応力の減少は BV/TV の減少に寄与することを示した。これらの結果は、アライメントや接触領域の変化が部位特異的な軟骨下骨の変化を誘導すること、また軟骨下骨の構造がメカニカルストレスの変化に影響することを示している。

6. 研究 4 ; 異なる関節における圧縮応力の減少が関節形成に与える影響

6.1. 目的

研究 1-3 の成果から，半月板の機能不全や接触領域の変化に伴う圧縮応力の変化が関節における骨形成や骨吸収に影響を与えることが明らかになった．これまでの報告では後肢懸垂や膝関節固定は，破骨細胞の活性化や関節軟骨の厚みの減少，骨量の減少を引き起こすことや⁴⁸⁾，脛骨に対する軸方向の圧縮負荷は骨量増大を引き起こすことが報告されている²⁶⁾．これらの報告はいずれも膝関節を中心に報告されている．研究 1-3 の成果も膝関節について着目したものである．よって，これまでの成果でみられた骨軟骨組織の変化が膝関節特有のものであるか，骨軟骨組織に共通する変化であるのかを明らかにするため，他関節での検証も求められる．そこで，研究 4 では，膝関節と同様に荷重関節として機能する股関節を対象に検証を行う．膝関節だけでなく，股関節を評価することで，荷重や関節運動を通したメカニカルストレスに対する骨軟骨組織のメカノレスポンス機構を明らかにすることを目指す．股関節における骨軟骨組織のメカノレスポンスを解明するために，本研究は後肢懸垂による圧縮応力の減少を再現する．さらに，週齢による骨モデリングやリモデリングの違いを検証するため，一般にメカニカルストレスが正常な関節形成に不可欠である発育期の股関節において，後肢懸垂による圧縮応力の減少を再現することで，関節の違いや週齢の違いを検証する．研究 1-3 までの膝関節における成果をもとに，荷重関節である股関節のメカノレスポンスを明らかにすることで，関節疾患の中心となる骨軟骨組織の変性・変化に対するメカニカルストレスの役割の解明を目指す．

これらより，本研究では発育期のマウスの股関節を対象にメカニカルストレスの減少が骨軟骨組織に与える影響の解明をを目的とした．

6.2. 方法

6.2.1. 倫理的配慮

本学研究倫理審査委員会の承認後（承認番号 2022-1），動物実験基本計画書ならびに実施計画書に従い研究を実施した．実験動物に対し，外科的介入，飼育中の疼痛軽減措置を実施した．

6.2.2. 対象と研究デザイン

対象は C57BL/6 系雌性マウス（4 週齢 15 匹）とした．対象に対して後肢懸垂介入を 4 週間実施する群(Short Term Hind limb Unloading 群；以下，STHU 群)と，8 週間実施する群(Long Term Hind limb Unloading 群；以下，LTHU 群)，Sham 群の 3 群に分類した(図 24-A)．介入群について介入期間終了後は自由飼育とし，生後 16 週時点で股関節を採取した．後肢懸垂中も水分摂取等は自由に行えるように調整した．また，組織採取時点で各群間に体重の有意差はみられなかった(図 24-B)．

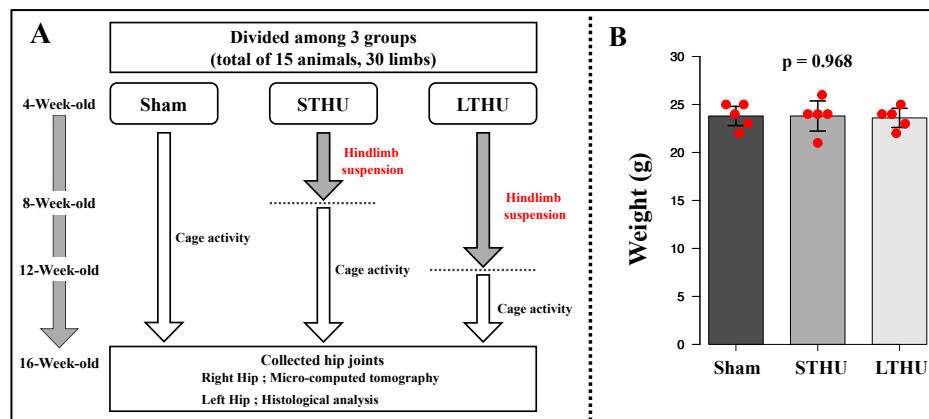


図 24. 研究デザインと各群の体重比較

研究デザインと屠殺時の体重比較の結果．(A) 対象を Sham 群，STHU 群，LTHU 群の 3 群に分類し，それぞれケージ内飼育と後肢懸垂による介入を実施した後，16 週齢時点で組織を採取し，マイクロ CT による解析と組織学的解析を実施した．(B) 組織採取時の体重計測結果．各群に有意差はみられなかった．データは平均値±95%CI で示す．

6.2.3. 実験モデルの作製

後肢懸垂群は尾に 25 ゲージ針とナイロン縫合糸を用いてテールリングを作製し，テールリングに針金を通すことでケージに吊り下げた．マウスの胴体とケージの床面が約 30° に設定し，前肢は自由に動かせるようにした．ケージ内での活動と健康状態，後肢の浮遊状態を 1 日に 1 度観察した．

6.2.4. 組織採取

16 週齢時点でマウスを炭酸ガスの吸引にて安楽死させた．その後，左右の後肢を骨盤から採取した．右後肢はマイクロ CT での骨形態計測までディープフリーザー（-80℃）内で保管した．左後肢は，4%Paraformaldehyde リン酸緩衝液にて 48 時間固定し，10%エチレンジアミン四酢酸溶液にて 2 週間脱灰処理を実施し，パラフィン置換によってパラフィンブロックを作成した．

6.2.5. マイクロ CT の測定

6.2.5.1. マイクロ CT による骨形態の計測

股関節を中心とした骨形態学的解析のため，マイクロ CT（Skyscan 1272, Bruker, MA, USA）を用いて対象組織のスキャンを行い，透過像を取得した．撮影条件は，X 線電圧 60kV，X 線電流 165 μ A，フィルター AI 0.25mm，角度ピッチ 0.6°，平均化処理回数 3 回とし，ピクセルサイズ 7.5 μ m で撮影した．取得した透過像を再構成用のソフトウェア NRecon（Bruker, MA, USA）を用いて再構成を行った．

6.2.5.2. 骨形態学的解析

取得した再構成画像を巨視的に観察した後，大体骨頭を関心領域に指定し，骨構造の解析を実施した．解析は画像解析ソフトウェア CTAn (Bruker, MA, USA) を用いて骨体積比 (Bone volume/Tissue volume ; BV/TV, %) を算出した．

6.2.6. 組織学的解析

6.2.6.1. 組織標本作製

対象のパラフィンブロックをマイクロトーム ROM380 (Yamato Kohki Industrial Co, Ltd, JPN) を用いて薄切し，水平断切片 ($6\mu\text{m}$) を作成した．

6.2.6.2. Safranin O Fast Green 染色

股関節の形態を観察するため，Safranin O Fast Green 染色を行った．染色後，大体骨頭，関節唇の染色性や形態の観察を実施した．

6.2.6.3. 免疫組織化学染色

メカニカルストレスの減少が軟骨内骨化プロセスに与える影響を評価するため，軟骨の特異的マーカーである Collagen type II と，骨化に伴う肥大化軟骨細胞の特異的マーカーである Collagen type X の局在性と発現を評価するため，免疫組織化学染色を実施した．染色方法は研究 1 と同様に Avidin-Biotinylated enzyme Complex 法を用いて実施し，一次抗体を Rabbit Anti-Collagen II antibody (希釈濃度 1/200 ; bs-0709R; Bioss) と，Rabbit Anti-Collagen X antibody (希釈濃度 1/200 ; NBP3-03757; Novus Biologicals) とした．Collagen type II の解析には，

画像解析ソフト ImageJ/Fiji を用いて、関節軟骨領域における Collagen type II の染色強度を算出し、Sham 群の染色強度で補正した後、染色強度を比較した。Collagen type X の解析として、各切片の関節軟骨領域の陽性細胞率を算出し各群間で Collagen type X の陽性細胞率を比較した。

6.2.6.4. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)染色

破骨細胞の活性を評価するため、TRAP 染色キット (Wako) のプロトコルに従って TRAP 染色を行った。解析は、大体骨頭の骨化領域における TRAP 染色陽性細胞で表される破骨細胞面 (Osteoclast surface / Bone surface ; Oc.S/BS, %) を算出した。

6.2.7. 統計解析

全てのデータに対し Shapiro-Wilk 検定による正規性の検証を行った。その後、全てのデータについて一元配置分散分析を用いて解析を行なった。その後、多重比較として Tukey-Kramer 法を用いた。統計解析には、統計解析ソフト R version3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用し、有意水準を 5%とした。

6.3. 結果

6.3.1. マイクロ CT による骨構造解析結果

マイクロ CT による大腿骨頭の骨構造解析結果を図 25 に示した。Sham 群では骨頭における骨梁構造の形成が確認できたが、STHU 群と LTHU 群では骨梁構造が確認できなかった。また、大腿骨頭の BV/TV の解析の結果、Sham 群と比較して STHU 群と LTHU 群の BV/TV が有意に低値を示した (Sham vs. STHU, $p = 0.004$; Sham vs. LTHU, $p = 0.006$)。

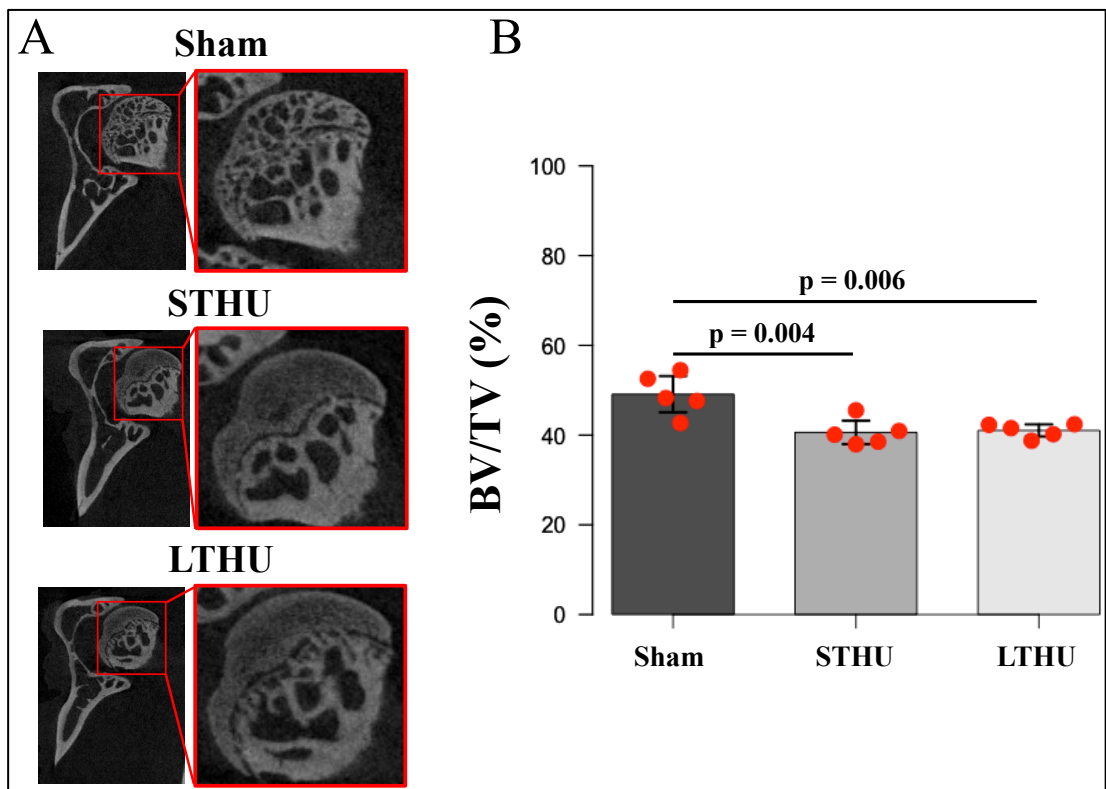


図 25. マイクロ CT による骨構造解析

マイクロ CT による骨構造解析結果. (A) 再構成画像. Sham 群では大腿骨頭に骨梁の形成がみられるが, STHU 群, LTHU 群では骨梁構造がみられなかった. (B) 大腿骨頭の BV/TV 解析結果. Sham 群と比較して, STHU 群と LTHU 群は低値を示した. データは平均値±95%CIで示す.

6.3.2. 関節軟骨の染色結果

股関節の Safranin O Fast Green 染色, Collagen type II の免疫組織化学染色の結果を図 26 に示した. Safranin O Fast Green 染色の染色結果では, 軟骨基質の染色性に大きな違いはみられず, 関節の形態においても大きな違いはみられなかった.

軟骨基質の主成分である Collagen type II の免疫組織化学染色の結果について, 大腿骨頭の軟骨領域における Collagen type II の染色強度を比較した. その結果, Sham 群に対して, STHU 群と LTHU 群の Collagen type II の染色強度が高値を示した (Sham vs. STHU, $p = 0.012$; Sham vs. LTHU, $p = 0.007$).

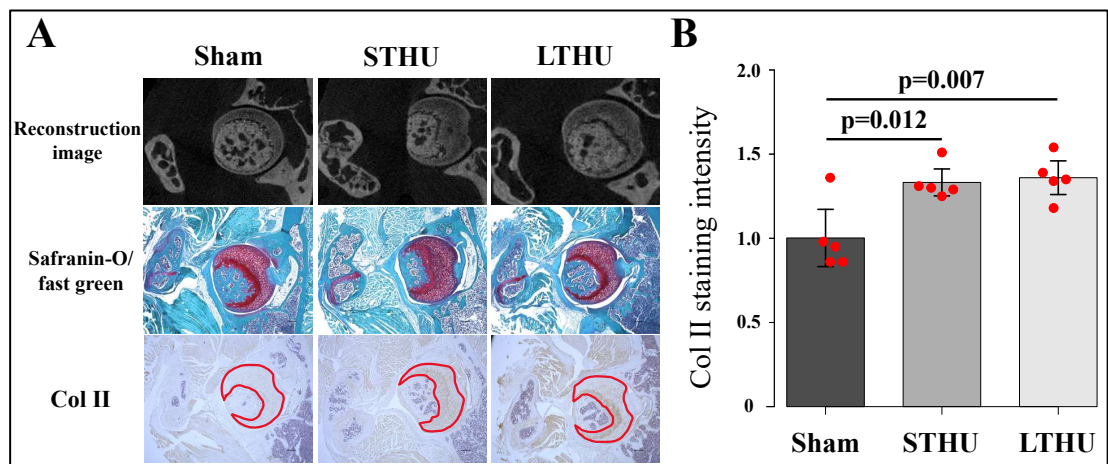


図 26. 関節軟骨の染色結果

大腿骨頭の関節軟骨染色結果. (A) Safranin O Fast Green 染色の染色性や関節の形態に大きな違いはみられなかった. Collagen type II の免疫組織化学染色の結果, STHU 群と LTHU 群の染色性が増強した.

(B) Collagen type II の染色強度の解析結果. STHU 群と LTHU 群の染色強度が Sham 群と比較して高値を示した. データは平均値 ± 95%CI で示す.

6.3.3. 肥大化軟骨細胞の染色結果

肥大化軟骨細胞の特異的マーカーである Collagen type X の免疫組織化学染色の結果を図 27 に示した. 大腿骨頭における Collagen type X の陽性細胞率を比較した結果, Sham 群に対して, STHU 群と LTHU 群の陽性細胞率が有意に低値を示した(Sham vs. STHU, $p = 0.009$; Sham vs. LTHU, $p = 0.014$).

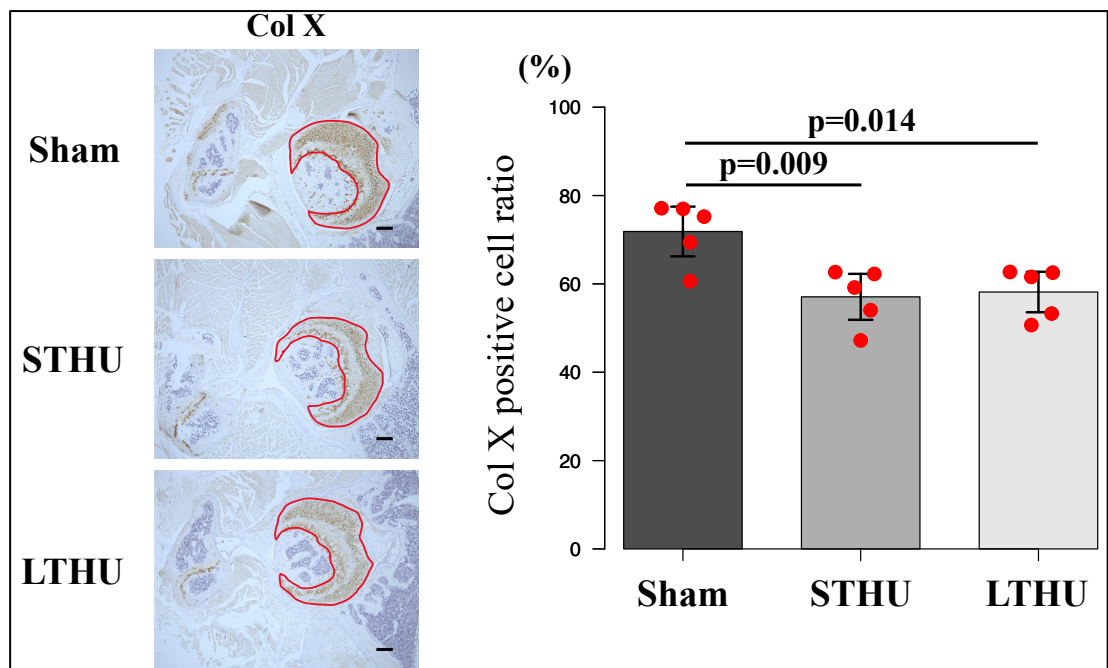


図 27. Collagen type X 染色結果

Collagen type X の染色結果. 大腿骨頭領域における Collagen type X の陽性細胞率を算出した(右図). STHU 群, LTHU 群の Collagen type X 陽性細胞率は Sham 群と比較して低値を示した. データは平均値 \pm 95%CI で示す.

6.3.4. 破骨細胞面の解析結果

TRAP 染色による破骨細胞面の解析結果を図 28 に示した。各群の大腿骨頭の骨領域における破骨細胞面を比較した結果, STHU 群と LTHU 群で高値を示す傾向がみられたが, 各群間での有意差はみられなかった。

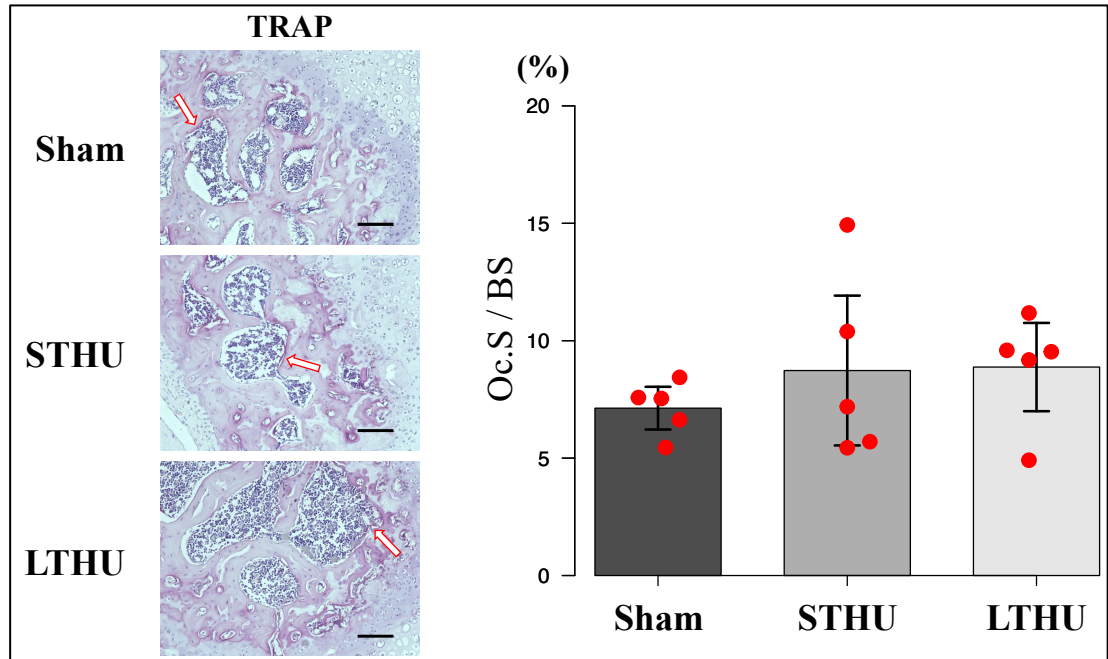


図 28. TRAP 染色結果

TRAP 染色の解析結果。大腿骨頭領域における破骨細胞面(Oc.S/BS)を算出した。各群間の Oc.S/BS に有意差はみられなかった。データは平均値±95%CI で示す。

6.4. 考察

研究 4 では発育期の骨軟骨組織に対するメカニカルストレスの減少が与える影響を検証した。後肢懸垂により、荷重による圧縮応力の減少を再現し、股関節における骨軟骨組織の形成を評価した。大腿骨頭における BV/TV は Sham 群と比較して STHU 群と LTHU 群で低下していた。また、Collagen type II と Collagen type X の免疫組織化学染色の結果から STHU 群と LTHU 群では Collagen type II の染色強度が高値を示し、Collagen type X の陽性細胞率は低値を示した。TRAP 染色による破骨細胞の活性を評価した結果、各群間で差はみられなかった。これらから、圧縮応力の減少は、軟骨細胞の肥大化を抑制し、発育期の骨軟骨組織に対して軟骨内骨化プロセスを遅延させることが明らかとなった。

後肢懸垂によるメカニカルストレスの減少は骨量の減少に寄与することが明らかとなっている^{27,66,67}。しかし、これまでの検証は骨格形成が完了した週齢、膝関節を中心とした検証が多くを占める。そのため、本研究では発育期のマウスを対象に検証を行った。結果、後肢懸垂による介入を実施した STHU 群と LTHU 群で大腿骨頭の BV/TV が低値を示した。大腿骨頭の領域では軟骨内骨化による骨形成が生じており、骨端軟骨から骨への置換が生じている。そのため、STHU 群と LTHU 群では圧縮応力の減少により骨への置換が抑制されている可能性が示唆された。さらに、後肢懸垂による圧縮応力の減少が軟骨内骨化プロセスに与える影響を評価するため、Collagen type II と Collagen type X の免疫組織化学染色を実施した。軟骨内骨化のプロセスでは軟骨細胞が肥大化軟骨細胞へと分化することで開始する。肥大化軟骨細胞は Collagen type X を特異的マーカーとし、MMP-3,-9,13などを分泌し、軟骨基質の分解に寄与する³⁷。さらに肥大化軟骨細胞は血管新生を誘導する Vascular

Endothelial Growth Factor (VEGF)や骨芽細胞の接着を可能にする Osteopontinなどを分泌することで骨化を誘導する。本研究では、STHU群とLTHU群では軟骨細胞の特異的マーカーである Collagen type IIの染色強度が高値を示し、肥大化軟骨細胞を示す Collagen type Xの陽性細胞率が低値を示した。よって後肢懸垂を行った STHU群とLTHU群では軟骨細胞が多く残存し、軟骨内骨化が抑制されたことが示唆された。加えて、後肢懸垂は骨形成に対して影響は与えるが、各群間で体重差はみられなかった。これらから、後肢懸垂による圧縮応力の減少は、軟骨内骨化プロセスを遅延させることが示唆された。

また、骨軟骨移行部では破骨細胞が局在し、骨梁形成に関与している。本研究で対象とした週齢は成長期にあたり、骨のモデリングによって骨形成が急速に進行する。骨のモデリングにおいては骨吸収や骨形成が独立して行われることが多い。本研究では骨軟骨移行部における破骨細胞の活性を評価した。その結果、後肢懸垂を実施した STHU群とLTHU群において破骨細胞の活性は認められなかった。破骨細胞は、微重力環境や、後肢懸垂によって活性化することが明らかとなっている^{27,68)}。これらから、成長過程のマウス大腿骨に対する圧縮応力の減少は破骨細胞の異常な活性化による骨モデリングを抑制しないことが示唆された。

さらに、後肢懸垂後の再荷重は、骨量などを回復させることが報告されている⁶⁹⁾。本研究結果から STHU群においても再荷重による骨量の回復は認められなかった。我々はこれまでに骨軟骨組織の変性・変化において破骨細胞と骨芽細胞によるリモデリングが関与しており、メカニカルストレスの変化に応じて骨吸収と骨形成を調節することを明らかにしてきた⁶⁰⁾。しかし、本研究結果から STHU群においても再荷重による骨量の回復は認められなかった。骨格の成長過程においては骨のリモ

デリングよりも骨のモデリングの作用が強く影響する。本研究では成長期の骨格形成において圧縮応力の減少による破骨細胞の異常な活性はみられないが、軟骨内骨化プロセスの遅延が長期に残存する可能性が示唆された。以上をまとめると、圧縮応力の減少は発育期における軟骨内骨化プロセスの遅延を通して、骨形成を抑制することが明らかとなった。

本研究の限界として、介入期間の影響が考えられる。本研究はマウスの骨成長が完了するとされる 16 週齢時点で組織採取を行い解析を実施した。そのため、STHU 群と LTHU 群でみられた BV/TV の低下や軟骨内骨化の抑制がより長期間の飼育で改善する可能性も考えられる。従って、軟骨内骨化に関連する因子の詳細な評価に加え、圧縮応力の減少が骨形成に及ぼす影響をより長期間で評価していく必要がある。

7. 研究 5 ; 軟骨下骨の硬さが軟骨細胞メカノレスポンスに与える影響

7.1. 目的

これまでの成果として、関節表層に位置する関節軟骨の変性には関節不安定性に伴う剪断力の増大が関与することを明らかにしてきた^{59,60)}。さらにメカニカルストレスは関節軟骨変性に対して強度依存的に作用することが明らかとなっており、適度なメカニカルストレスは軟骨保護に作用し、過度なメカニカルストレスは軟骨変性に寄与することが報告されていきた^{24,25,70,71)}。しかし、メカニカルストレスの作用を決定する要因は検討されておらず、骨軟骨組織のメカノレスポンスの決定要因は未解明である。関節軟骨を支える軟骨下骨の硬さの変化は表層の関節軟骨が受けるメカニカルストレスに影響を与え得る¹²⁾。さらに、*in vitro*においても軟骨細胞に対する適度な流体剪断力は軟骨保護に作用し⁷²⁾、過度な流体剪断力は軟骨細胞の異化因子放出を促進することが明らかになっている^{43,72,73)}。これらから、関節軟骨を支える軟骨下骨の硬さ変化が、表層の関節軟骨のメカノレスポンス機構に影響を与え、メカニカルストレスの強度依存的作用の決定要因であるのではないかと仮説した。従って本研究の目的は、科学的架橋剤を用いずに硬度が調節可能な新規の培養基材である量子ビーム加工ゲル⁷⁴⁾を用いて軟骨細胞を培養し、軟骨下骨の硬さ変化を模倣した状態で振とう培養による剪断力を付与することで軟骨細胞のメカノレスポンス機構を明らかにすることを目的とした。

7.2. 方法

7.2.1. 倫理的配慮

本学研究倫理審査委員会の承認後（承認番号 2022-14）、動物実験基本計画書ならびに実施計画書に従い研究を実施した。

7.2.2. 量子ビーム加工ゲル

量子ビーム加工ゲル(以下, 加工ゲル)はゼラチンと超純水のみを使用し, γ 線照射による弾性・地形制御(ET-RaM)技術を応用することで科学的架橋剤を用いずにゲル化させたコラーゲンハイドロゲルである⁷⁴⁾。 γ 線の照射時間により弾性率を調節可能であり, 照射時間が長いほど架橋密度が高くなり弾性率が高くなる。本研究では弾性率を4段階に調節し, 14kPa, 46kPa, 84kPa, 145kPaの硬さに設定し, 培養に用いた。

7.2.3. 初代軟骨細胞採取, 単離

従来のプロトコルに則り, 生後10日齢のマウスから初代軟骨細胞を採取した⁷⁵⁾。軟骨細胞培養には10%ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum; FBS)(biosera)と1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(Wako)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM Ham's F12; Wako)を使用した。初代軟骨細胞単離について, マウスを炭酸ガス吸引にて安楽死させた後, マウスの全身を70%エタノールで消毒した。その後, マウスの大腿骨頭, 大腿骨顆部, 脛骨近位端から関節軟骨をメスで切り落とした。採取した関節軟骨を滅菌PBSで洗浄し, 4mg/mlの濃度にDMEM Ham's F12(10%FBS, 0.1%PC-SM)で調節したコラゲナーゼ Type II (gibco)を用いて細胞分散させ, インキュベーター内で一晩インキュベートした。翌日, インキュベーター内から関節軟骨を取り出し, 70 μ mセルストレー

ナー使用し, 300G, 3min, 室温条件で遠心分離を行ったのち上清を除去した. 細胞数をカウントした後, プラスチックディッシュ(6well マルチプレート)に播種した. 2日に1度の頻度で培地交換を実施した.

7.2.4. 量子ビーム加工ゲルへの継代

初代軟骨細胞を4日間培養した後, 硬さの異なる量子ビーム加工ゲルとプラスチックディッシュ(6well マルチプレート)に継代した. 継代前に量子ビーム加工ゲルは, PBSを2ml入れ37°Cで2時間インキュベートし, PBSを除去した後 DMEM Ham's F12(10%FBS,0.1%PC-SM)を2ml入れて37°Cで1時間インキュベートしたものを培養に用いた.

細胞回収には TrypLE Express(gibco)を用いた. その後, 硬さの異なる量子ビーム加工ゲルとプラスチックディッシュ(6well マルチプレート)に細胞を播種した. 継代後も2日に1度の頻度で培地交換を実施した.

7.2.5. 振とう培養プロトコール

各ゲルとプラスチックディッシュに軟骨細胞を継代してから2日後から振とう培養によって軟骨細胞に流体剪断力を負荷した. 振とう培養には CO₂ インキュベーターシェーカーS41i(eppendorf)を使用した. 培養期間は5日間とし, 2日に1度の頻度で培地交換を実施した. 振とう培養強度は0RPM, 50RPM, 75RPMの3条件とし, 各プレートはシェーカーの中心からの距離が等しくなる位置に設置した. 振とう培養終了時にオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE CO, JPN) を用いて細胞形態の観察を実施した.

7.2.6. 分子生物学的解析

振とう培養後，定量 PCR (quantitative Polymerase Chain Reaction : qPCR) による遺伝子発現解析を行った．ISOGEN(NIPPON GENE)を用いて細胞から total RNA を抽出し，High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, CA, USA) と Thermal Cycler Palm-Cycler (Corbett Research, SYD, AUS) を用いて total RNA から cDNA を合成した．解析には Step OnePlus system(Applied Biosystems) と TaqMan® Fast Advanced Master Mix(Thermo Scientific)を使用した．

使用する Primer は collagen type II alpha 1 (Col2a1), Aggrecan (Acan), matrix metalloproteinase 3 (MMP-3), tumor necrosis factor- α (TNF- α) とし，ハウスキーピング遺伝子として Gapdh (Mm99999915_g1)を使用した．分子生物学的解析に用いた Primer に関して以下に示した．

解析には $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて，標的遺伝子の相対発現量を異なる強度の剪断力における比較と，同一強度の剪断力における培養条件間での比較を実施した．

遺伝子名	製品番号	VIC/FAM
Gapdh	Mm99999915_g1	VIC
Col2a1	Mm01309565_m1	FAM
Acan	Mm00545794_m1	FAM
TNF- α	Mm00443258_m1	FAM
MMP-3	Mm00440295_m1	FAM

7.2.7. 統計解析

全てのデータに対し Shapiro-Wilk 検定による正規性の検証を行った。その後、全てのデータについて一元配置分散分析を用いて解析を行なった。その後、多重比較として Tukey-Kramer 法を用いた。統計解析には、統計解析ソフト R version3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用し、有意水準を 5%とした。

7.3. 結果

7.3.1. 軟骨細胞の巨視的観察

培養条件ごとの軟骨細胞の巨視的観察結果を図 29 に示した。6well プラスチックディッシュでは丸みを帯びた形状が観察されたが、加工ゲルでは硬度が固くなるにつれて細胞の丸みが減少する傾向がみられた。また、加工ゲルの硬度が固くなるにつれて細胞増殖能が低下する様子が見られた。

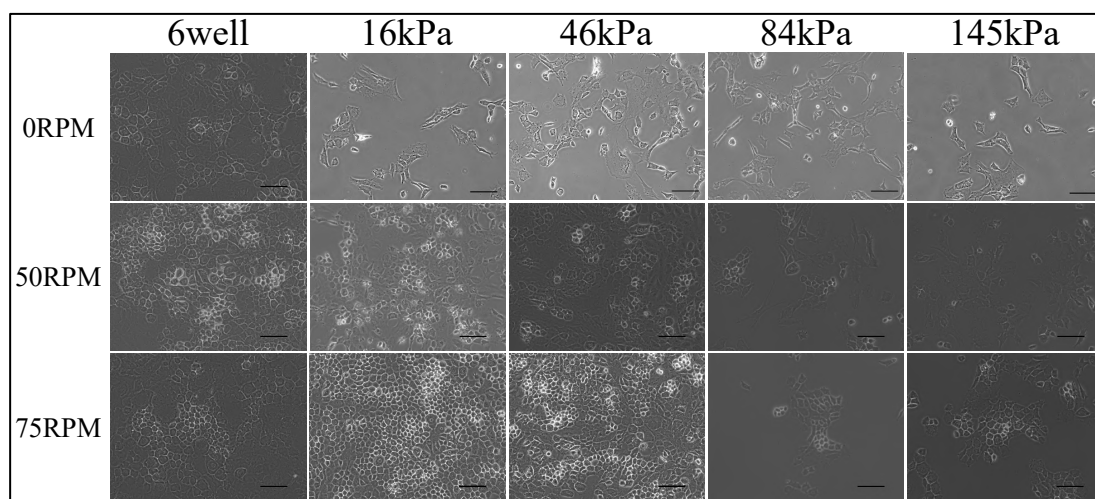


図 29. 細胞形態の観察結果

各条件下での軟骨細胞の形態。6well プラスチックディッシュでは丸みを帯びた形状が観察されたが、加工ゲルでは硬度が固くなるにつれて細胞の丸みが減少し、細胞の増殖能も軽減している様子が見られた。

7.3.2. 分子生物学的解析結果

7.3.2.1. 異なる強度の剪断力に対する解析結果

培養条件ごとの異なる強度における各標的遺伝子の相対発現量を比較した。6well プラスチックディッシュの解析結果を図 30 に示した。Col2a1 の発現量は 0RPM と比較して 50RPM, 75RPM 条件で有意に増加した(0RPM vs. 50RPM, $p < 0.001$; 0RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$)。Acan の発現量に有意差はみられなかった。TNF- α の発現量は 75RPM 条件が他の条件と比較して有意に減少した(0RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$)。MMP-3 の発現量に有意差はみられなかった。

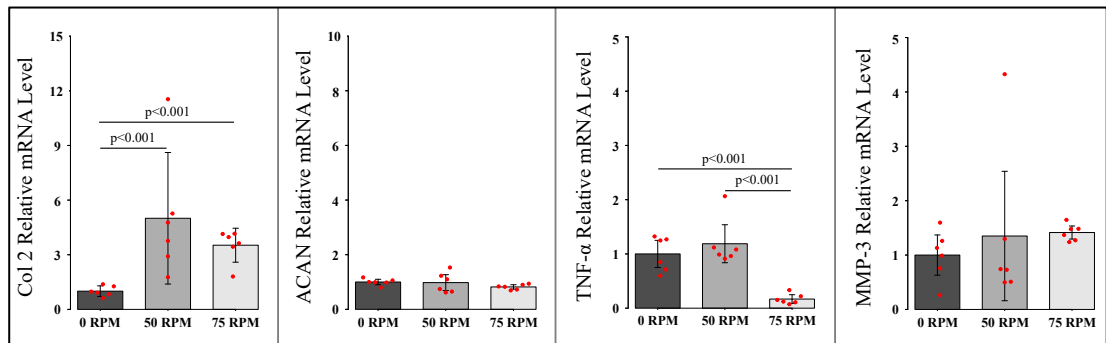


図 30. 6well プラスチックディッシュにおける各因子の発現量

プラスチックディッシュにおける各遺伝子の解析結果。Col2a1 は 0RPM と比較して 50RPM, 75RPM で発現量が増加した。Acan の発現量に有意差はみられなかった。TNF- α は 0RPM, 50RPM と比較して 75RPM で発現量が減少した。MMP-3 の発現量に有意差はみられなかった。データは平均値 \pm 95%CI で示す。

16kPa の加工ゲルの解析結果を図 31 に示した。Col2a1 の発現量は 75RPM 条件が他の条件と比較して有意に減少した(0RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$)。Acan の発現量は 50RPM 条件が 0RPM 条件と比較して有意に増加し, 75RPM 条件が他の条件と比較して有意に増加した(0RPM vs. 50RPM, $p = 0.004$; 0RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$)。TNF- α の発現量は 75RPM 条件が他の条件と比較して有意に減少した(0RPM vs. 75RPM, $p = 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p = 0.043$)。MMP-3 の発現量は 75RPM 条件が他の条件と比較して有意に減少した(0RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$)。

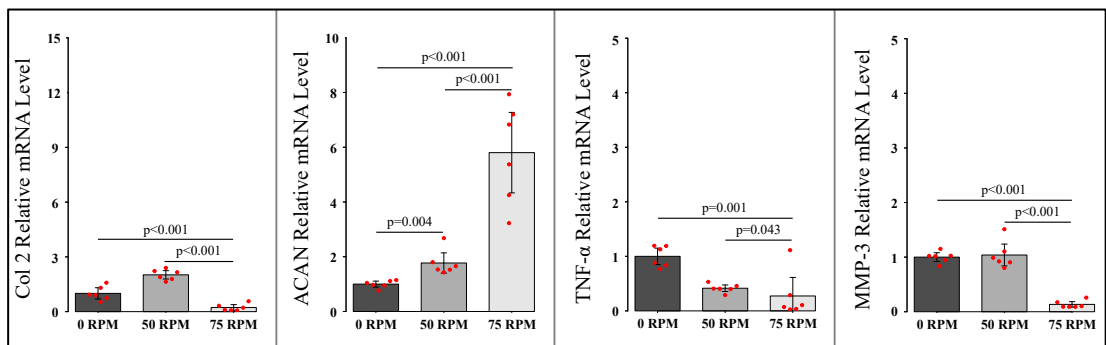


図 31. 16kPa 加工ゲルにおける各因子の発現量

16kPa 加工ゲルにおける各遺伝子の解析結果。Col2a1 は 0RPM, 50RPM と比較して 75RPM で発現量が減少した。Acan は 0RPM と比較して 50RPM, 75RPM で発現量が増加した。TNF- α は 0RPM, と比較して 50RPM, 75RPM で発現量が減少した。MMP-3 は 0RPM, 50RPM と比較して 75RPM で発現量が減少した。データは平均値 \pm 95%CI で示す。

46kPa の加工ゲルの解析結果を図 32 に示した. Col2a1 の発現量に有意差はみられなかった. Acan の発現量は 50RPM 条件が 0RPM 条件と比較して有意に増加し, 75RPM 条件が他の条件と比較して有意に増加した(0RPM vs. 50RPM, $p = 0.001$; 0RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$). TNF- α と MMP-3 の発現量に有意差はみられなかった.

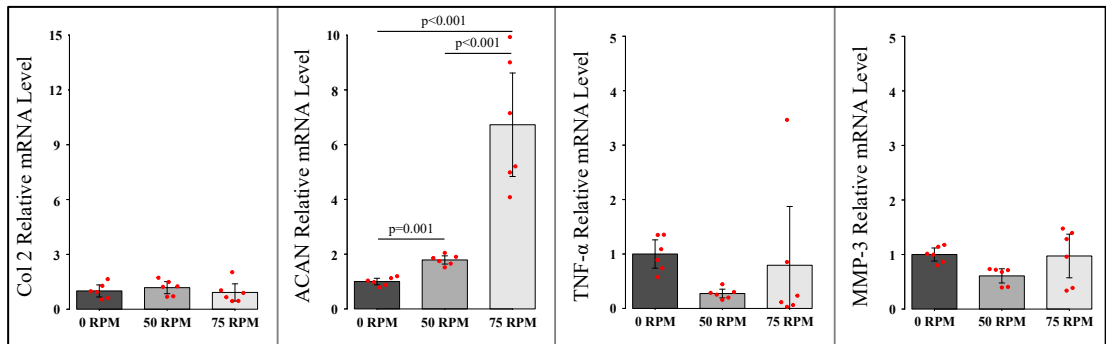


図 32. 46kPa 加工ゲルにおける各因子の発現量

46kPa 加工ゲルにおける各遺伝子の解析結果. Col2a1 の発現量に有意差はみられなかった. Acan は 0RPM と比較して 50RPM, 75RPM で発現量が増加した. TNF- α の発現量に有意差はみられなかった. MMP-3 の発現量に有意差はみられなかった. データは平均値 \pm 95%CI で示す.

84kPa の加工ゲルの解析結果を図 33 に示した. Col2a1 の発現量は 75RPM 条件が他の条件と比較して有意に増加した(0RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$). Acan と TNF- α の発現量に有意差はみられなかった. MMP-3 の発現量は 75RPM 条件が 0RPM 条件と比較して有意に増加した(0RPM vs. 75RPM, $p = 0.001$).

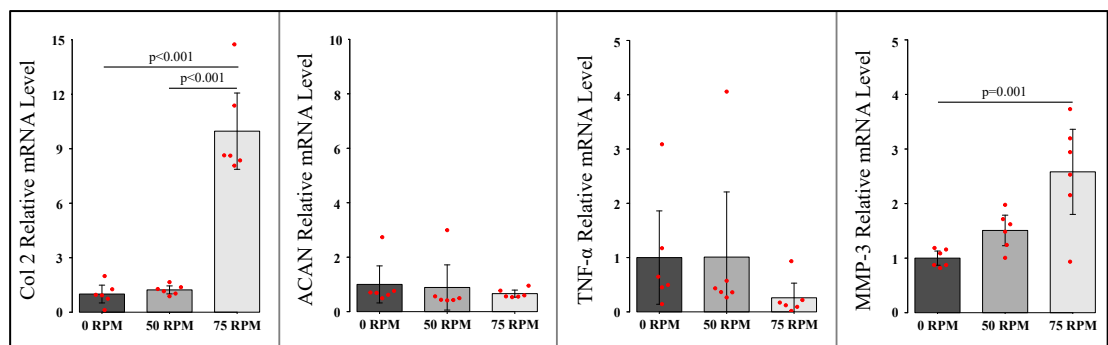


図 33. 84kPa 加工ゲルにおける各因子の発現量

84kPa 加工ゲルにおける各遺伝子の解析結果. Col2a1 は 0RPM と比較して 50RPM, 75RPM で発現量が増加した. Acan の発現量に有意差はみられなかった. TNF- α の発現量に有意差はみられなかった. MMP-3 は 0RPM と比較して 75RPM で発現量が増加した. データは平均値 \pm 95%CI で示す.

145kPa の加工ゲルの解析結果を図 34 に示した。Col2a1 の発現量は 50RPM 条件が 0RPM 条件と比較して有意に減少し、75RPM 条件が他の条件と比較して有意に増加した(0RPM vs. 50RPM, $p = 0.001$; 0RPM vs. 75RPM, $p = 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$)。Acan の発現量は 75RPM 条件が他の条件と比較して有意に増加した(0RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p = 0.005$)。TNF- α の発現量は 75RPM 条件が 0RPM 条件と比較して有意に減少した(0RPM vs. 75RPM, $p = 0.004$)。MMP-3 の発現量は 75RPM 条件が他の条件と比較して有意に増加した(0RPM vs. 75RPM, $p = 0.001$; 50RPM vs. 75RPM, $p < 0.001$)。

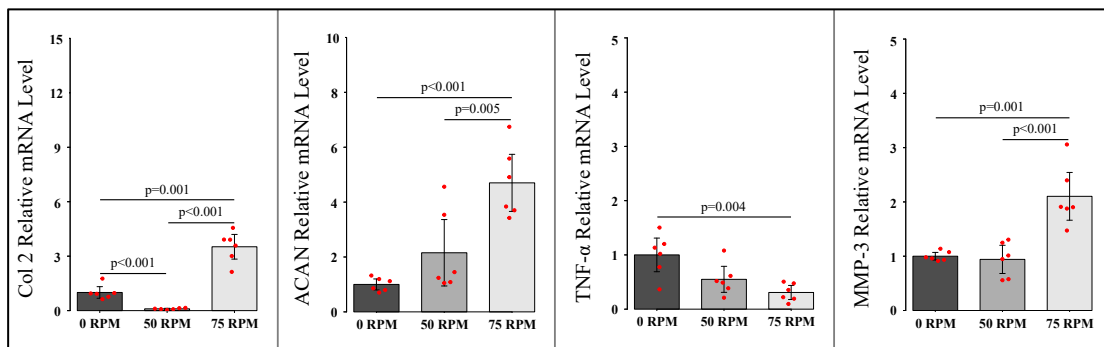


図 34. 145kPa 加工ゲルにおける各因子の発現量

145kPa 加工ゲルにおける各遺伝子の解析結果。Col2a1 は 0RPM と比較して 50RPM で発現量が減少し、0RPM, 50RPM と比較して 75RPM で発現量が増加した。Acan は 0RPM, 50RPM と比較して 75RPM で発現量が増加した。TNF- α は 0RPM と比較して 75RPM で発現量が減少した。MMP-3 は 0RPM, 50RPM と比較して 75RPM で発現量が増加した。データは平均値 \pm 95%CI で示す。

7.3.2.2. 同一強度の剪断力における解析結果

同一強度における異なる培養条件間の各標的遺伝子の相対発現量を比較した。Col2a1 の発現量について解析結果を図 35 に示した。0RPM では 84kPa 加工ゲルが他の条件と比較して Col2a1 の発現量が有意に減少した(84kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 84kPa vs. 16kPa, $p = 0.002$; 84kPa vs. 46kPa, $p = 0.004$; 84kPa vs. 145kPa, $p < 0.001$)。

50RPM では 6well と比較して全ての加工ゲルで Col2a1 の発現量が減少した(6well vs. 16kPa, $p = 0.008$; 6well vs. 46kPa, $p < 0.001$; 6well vs. 84kPa, $p < 0.001$; 6well vs. 145kPa, $p < 0.001$)。16kPa と 46kPa における Col2a1 の発現量が 84kPa と 145kPa と比較して有意に増加した(16kPa vs. 84kPa, $p < 0.001$; 16kPa vs. 145kPa, $p < 0.001$; 46kPa vs. 84kPa, $p = 0.003$; 46kPa vs. 145kPa, $p < 0.001$)。さらに 84kPa の Col2a1 の発現量が 145kPa と比較して有意に増加した(84kPa vs. 145kPa, $p = 0.001$)。

75RPM では 16kPa と 46kPa における Col2a1 の発現量が 6well と比較して有意に減少した(16kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 46kPa vs. 6well, $p < 0.001$)。84kPa と 145kPa における Col2a1 の発現量が 16kPa と 46kPa と比較して有意に増加し c(84kPa vs. 16kPa, $p < 0.001$; 84kPa vs. 46kPa, $p = 0.001$; 145kPa vs. 16kPa, $p < 0.001$; 145kPa vs. 46kPa, $p < 0.001$)。さらに 16kPa の Col2a1 の発現量が 46kPa と比較して有意に減少した(16kPa vs. 46kPa, $p < 0.001$)。

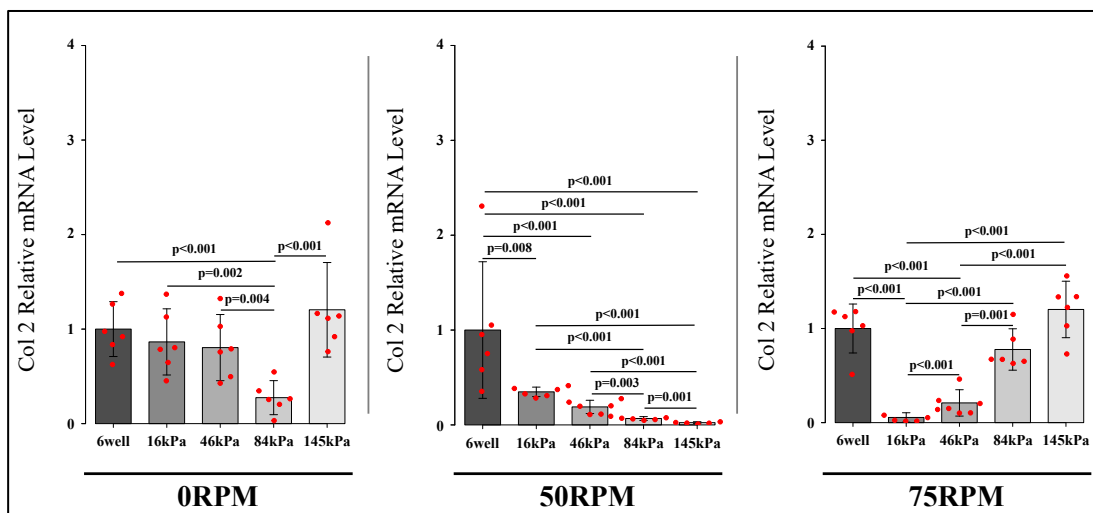


図 35. 各強度における Col2a1 の発現量

各振とう強度における Col2a1 の解析結果. 0RPM では, 84kPa が他の群と比較して Col2a1 の発現量が減少した. 50RPM では, 加工ゲルの硬度が固くなるにつれて Col2a1 の発現量が減少した. 75RPM では, 加工ゲルの硬度が固くなるにつれて Col2a1 の発現量が増加した. データは平均値±95%CI で示す.

Acan の発現量について解析結果を図 36 に示した。0RPM では 6well と比較して全ての加工ゲルで Acan の発現量が減少した(6well vs. 16kPa, $p < 0.001$; 6well vs. 46kPa, $p < 0.001$; 6well vs. 84kPa, $p < 0.001$; 6well vs. 145kPa, $p < 0.001$)。また、84kPa における Acan の発現量が他の加工ゲルと比較して増加した(84kPa vs. 16kPa, $p = 0.001$; 84kPa vs. 46kPa, $p < 0.001$; 84kPa vs. 145kPa, $p < 0.001$)。さらに 46kPa, 145kPa における Acan の発現量は 16kPa と比較して有意に減少した(16kPa vs. 46kPa, $p < 0.001$; 16kPa vs. 145kPa, $p = 0.004$)。

50RPM では 6well と比較して全ての加工ゲルで Acan の発現量が減少した(6well vs. 16kPa, $p < 0.001$; 6well vs. 46kPa, $p < 0.001$; 6well vs. 84kPa, $p = 0.002$; 6well vs. 145kPa, $p < 0.001$)。また、84kPa における Acan の発現量が 46kPa, 145kPa と比較して有意に増加した(84kPa vs. 46kPa, $p = 0.001$; 84kPa vs. 145kPa, $p = 0.020$)。さらに 16kPa における Acan の発現量が 46kPa と比較して有意に増加した(16kPa vs. 46kPa, $p = 0.040$)。

75RPM では 145kPa における Acan の発現量が 6well と比較して有意に減少した(145kPa vs. 6well, $p = 0.044$)。

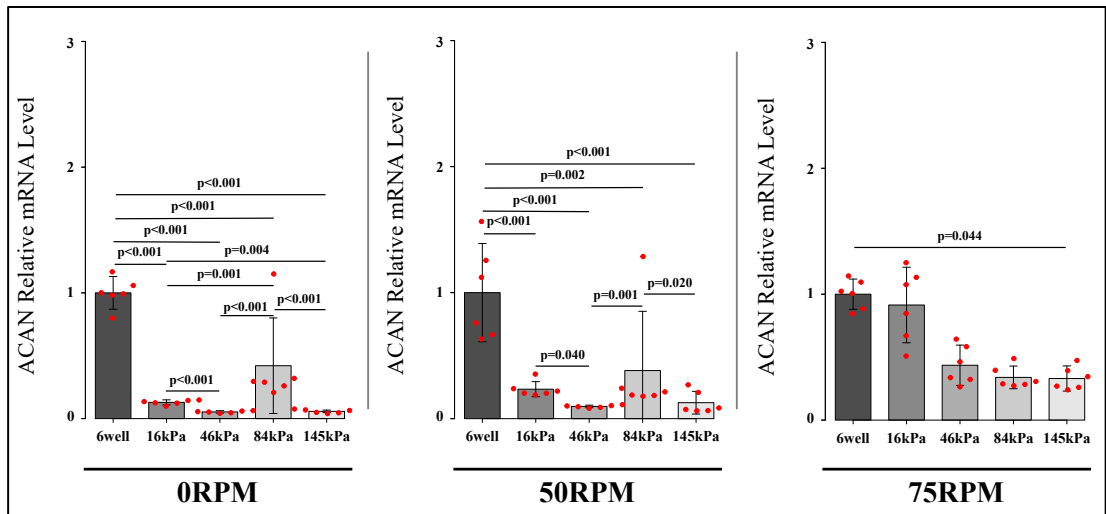


図 36. 各強度における Acan の発現量

各振とう強度における Acan の解析結果. 0RPM では, 84kPa が他の加工ゲルと比較して Acan の発現量が増加した. 50RPM では, 84kPa が 46kPa, 145kPa と比較して Acan の発現量が増加し, 16kPa が 46kPa と比較して Acan の発現量が増加した. 75RPM では 145kPa がプラスチックディッシュと比較して Acan の発現量が減少した. データは平均値±95%CI で示す.

TNF- α の発現量について解析結果を図 37 に示した. 0RPM では 84kPa における TNF- α の発現量が 16kPa と比較して有意に増加した (84kPa vs. 16kPa, $p = 0.044$).

50RPM では 84kPa における TNF- α の発現量が他のゲルと比較して有意に増加し (84kPa vs. 16kPa, $p < 0.001$; 84kPa vs. 46kPa, $p < 0.001$; 84kPa vs. 145kPa, $p = 0.018$), 16kPa と 46kPa における TNF- α の発現量が 6well と比較して有意に減少した (16kPa vs. 6well, $p = 0.010$; 46kPa vs. 6well, $p = 0.001$).

75RPM では TNF- α の発現量に有意差はみられなかった.

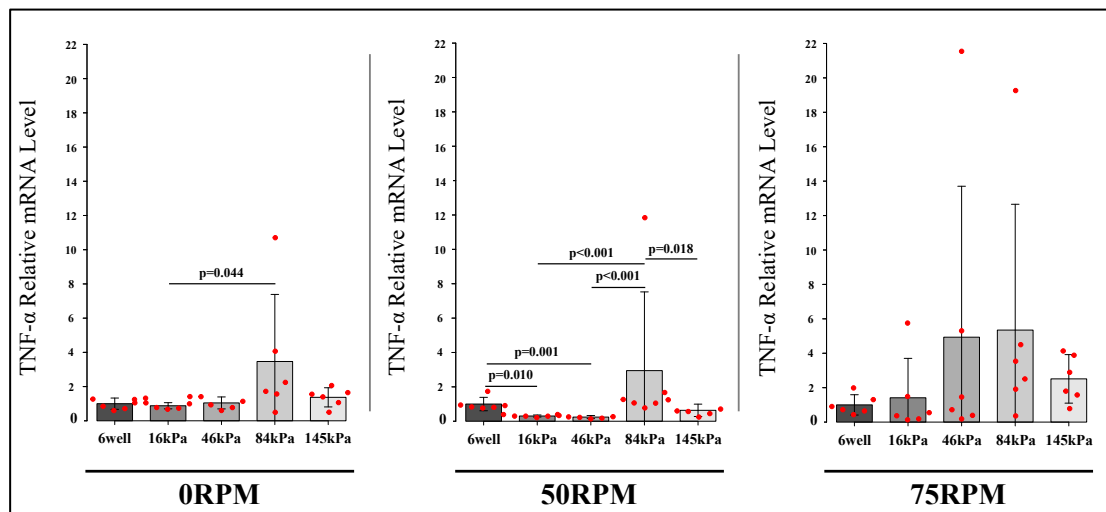


図 37. 各強度における TNF- α の発現量

各振とう強度における TNF- α の解析結果. 0RPM では, 84kPa が 16kPa と比較して TNF- α の発現量が増加した. 50RPM では, 84kPa が他の加工ゲルと比較して TNF- α の発現量が増加し, 16kPa と 46kPa がプラスチックディッシュと比較して TNF- α の発現量が減少した. 75RPM では TNF- α の発現量に有意差はみられなかった. データは平均値 \pm 95%CI で示す.

MMP-3 の発現量について解析結果を図 38 に示した. 0RPM では全ての加工ゲルにおける MMP-3 の発現量が 6well と比較して増加した (16kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 46kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 84kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 145kPa vs. 6well, $p < 0.001$).

50RPM でも同様に全ての加工ゲルにおける MMP-3 の発現量が 6well と比較して増加した (16kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 46kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 84kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 145kPa vs. 6well, $p < 0.001$).

75RPM では全ての加工ゲルにおける MMP-3 の発現量が 6well と比較して増加した (16kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 46kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 84kPa vs. 6well, $p < 0.001$; 145kPa vs. 6well, $p < 0.001$). また, 84kPa と 145kPa における MMP-3 の発現量が 16kPa, 46kPa と比較して有意に増加し (84kPa vs. 16kPa, $p < 0.001$; 84kPa vs. 46kPa, $p = 0.030$; 145kPa vs. 16kPa, $p < 0.001$; 145kPa vs. 46kPa, $p = 0.002$), 46kPa における MMP-3 の発現量が 16kPa と比較して有意に増加した (46kPa vs. 16kPa, $p < 0.001$).

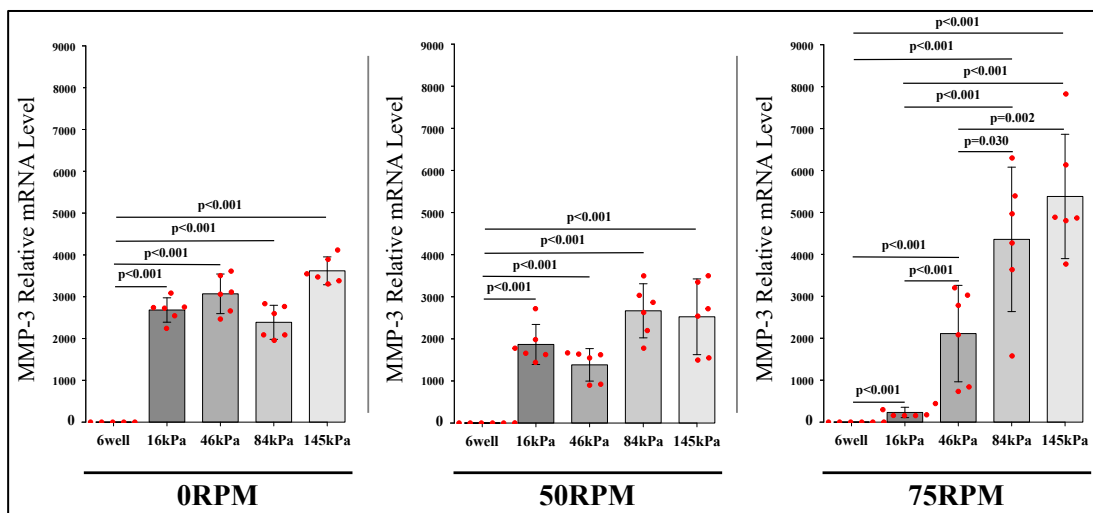


図 38. 各強度における MMP-3 の発現量

各振とう強度における MMP-3 の解析結果. 0RPM では, 全ての加工ゲルがプラスチックディッシュと比較して MMP-3 の発現量が増加した. 50RPM でも, 全ての加工ゲルがプラスチックディッシュと比較して MMP-3 の発現量が増加した. 75RPM では全ての加工ゲルがプラスチックディッシュと比較して MMP-3 の発現量が増加し, 加工ゲルの硬度が固くなるにつれて MMP-3 の発現量が増加した. データは平均値 ± 95%CI で示す.

7.4. 考察

本研究は、関節軟骨を支える軟骨下骨の硬さ変化を、量子ビーム加工ゲルを用いて再現し、異なる高度の軟骨細胞の剪断力に対するメカノレスポンス機構を評価した。その結果、比較的柔らかい硬度の加工ゲルでは低強度の剪断力に対して Col2a1 の発現量増加を示し、比較的硬い硬度の加工ゲルではより高強度の剪断力に対して Col2a1 の発現量増加を示した。この結果は、関節軟骨を支える軟骨下骨の硬さが関節軟骨の恒常性維持と破綻を招くメカニカルストレスの強度依存的な作用を決定する一つの要因であることを明らかにした。

細胞培養基材の弾力性や形状、組成は細胞の形態、遊走性、増殖やアポトーシスなどに大きな影響を及ぼすことが明らかとなっている⁷⁶⁻⁷⁹⁾。本研究で用いた量子ビーム加工ゲルは、硬化剤を用いずに細胞外基質 (Extracellular matrix ; ECM) の主成分であるコラーゲンの濃度と γ 線照射による架橋形成密度を調節することで硬度を調節可能である。本来、生体内の ECM の硬度においてコラーゲンの濃度と弾性率は相関関係にある⁸⁰⁾。しかし、人工ハイドロゲルではこの相関関係が失われ、硬度を固くするためには科学的架橋剤が必要となる。この科学的架橋剤は細胞適合性や生分解性を変化させる⁸¹⁾。そのため、硬化剤や科学的架橋剤を用いない量子ビーム加工ゲルはこれら既存のバイオマテリアルの問題を解決した新規素材であり、生体内により近い環境を再現可能となる。

軟骨細胞の巨視的観察結果について、軟骨細胞はプラスチックディッシュを用いた単層培養において丸みを帯びた形状を示すことが明らかになっている⁷⁵⁾。本研究結果において、硬度を変化させた加工ゲルを用いた3次元培養では硬度が固くなるにつれて軟骨細胞の丸みが減少する傾向がみられた。先行研究においても培養基材の硬さ変化が軟骨細胞の形

態変化に影響することが報告されている^{82,83)}。さらに本研究で用いた加工ゲルよりもさらに硬い培養基材を用いた検証において、硬い培養基材の上に培養した軟骨細胞では軟骨変性因子である MMP-13 や軟骨細胞の肥大化を示す Collagen type X の発現増加が報告されている⁸³⁾。本研究において、0RPM 条件における各標的遺伝子の発現量の特徴として、加工ゲルを用いた 3 次元培養では硬さに関係なくプラスチックディッシュを用いた単層培養と比較して MMP-3 の発現量が大きく増加していた。Acan では加工ゲルを用いた 3 次元培養ではプラスチックディッシュと比較して発現量が減少していたが算出された発現量の差は MMP-3 よりも小さく、Col2a1 においては 84kPa を除いてプラスチックディッシュと比較して有意差はみられなかった。よって、軟骨変性因子である MMP-3 の発現量の増大はみられたが、Col2a1 の発現量から軟骨細胞の異化が促進されていないことが示され、加工ゲルを用いた培養では軟骨変性ではなく代謝活性が促進された可能性が考えられる。これらから、本研究で用いた新規の培養基材である量子ビーム加工ゲルは、先行研究同様に硬さの変化が軟骨細胞の形態に影響を及ぼし、軟骨細胞の代謝活性を引き起こす可能性が示唆された。

各硬度の加工ゲルに対して異なる強度の剪断力が標的遺伝子の発現に与える影響に関して、本研究では γ 線照射によるコラーゲンの架橋密度を変化させることでゲルの硬さを変化させ、16・46・84・145kPa の 4 条件の硬度の加工ゲルを用いて検証した。

16kPa の加工ゲルでは軟骨細胞の特異的マーカーである Col2a1 の発現量が 50RPM で最も発現量が多く、75RPM では 0RPM, 50RPM と比較して有意に発現量が減少していた。46kPa では有意差はないものの同様の結果がみられ、比較的柔らかい硬度のゲルでは低強度の剪断力に対

して軟骨細胞は軟骨の合成・同化を促進させ、高強度の剪断力に対しては軟骨異化が促進される可能性が示唆された。一方で、84・145kPaではCol2a1の発現量が75RPMで最も発現量が増加していた。これは柔らかいゲルとは異なる特徴であり、硬度が固くなるにつれてより高強度の剪断力が軟骨の合成・同化を促進させる可能性を示唆するものである。この結果は、適度なメカニカルストレスが軟骨保護に関与するとするこれまでの通説に対し、この軟骨表層から負荷される“適度な強度”は、軟骨下骨の硬さ変化によって異なる可能性があることを示すものである。

一方で、Acanの発現量は16・46・145kPa硬度に関係なく剪断力の強度が上がるにつれて発現量が増加した。Col2とAcanは関節軟骨のECMを構成する主成分である。先行研究において軟骨細胞は動的圧縮負荷に対してCol2よりもAcanの発現量を増大させることが報告されている⁸⁴⁾。本研究では剪断力に対する軟骨細胞のメカノレスポンスを検証した。Col2とAcanは共に関節軟骨を構成する主成分であるが、軟骨細胞のメカノレスポンス機構においてCol2とAcanはそれぞれ別のメカニズムによって発現が制御されている可能性が示唆された。

TNF- α とMMP-3の発現に関して、TNF- α は炎症性サイトカインとして、MMP-3は軟骨変性因子として関節軟骨変性に関与する。本研究結果からTNF- α の発現量は剪断力の負荷によって増加しなかった。また、MMP-3においても84kPa、145kPaを除いて剪断力の負荷によって増加しなかった。また、84kPa、145kPaは75RPM条件においてCol2a1の発現量が最大となっていることから軟骨変性は生じていないことが示唆された。本研究では異なる強度の剪断力に対する軟骨細胞のメカノレスポンス機構を検証するため、0・50・75RPMの強度で振とう培養による剪断力を軟骨細胞に加えた。これまでに振とう培養によるメカニカル

ストレスの影響を検証した報告において 30RPM の強度はウシ軟骨細胞の増殖を促進すること⁸⁵⁾、30RPM の強度を周期的に加える条件では骨髄由来間葉系幹細胞の増殖や生存率に影響しないが 60RPM の強度では骨髄由来間葉系幹細胞の増殖、生存率を低下させることが明らかとなっている⁸⁶⁾。これらの報告を元に本研究では強度の設定を行ったが、関節軟骨を変性させ得る高強度のメカニカルストレスとはならず、TNF- α と MMP-3 の発現量を軟骨変性を惹起するレベルまで増加させなかったことが示唆された。

以上の結果から、同一強度の剪断力においても加工ゲルの硬さに応じて関節軟骨の主成分である Col2a1 の発現パターンの増減が異なることが明らかとなった。この結果は、軟骨下骨の硬さ変化は剪断力に対する軟骨細胞のメカノレスポンス機構に影響することを示すものである。

本研究の限界として、剪断力の強度が挙げられる。前述したように、本研究で設定した強度では TNF- α や MMP-3 といった軟骨変性因子の発現増加に伴う Col2a1 や Acan の発現量の減少にみられるような軟骨変性所見はみられなかった。従って、今後はより高強度での検証を加え、剪断力に対する軟骨細胞のメカノレスポンス機構の詳細を明らかにする必要がある。

8. 総括

本論文では、関節における骨軟骨組織のメカノレスポンスを解明するために、メカニカルストレスの質に着目したモデル間の比較や、メカニカルストレスの増減を再現した検証を実施した。その結果、関節軟骨変性には剪断力が関与し、軟骨下骨に対して圧縮応力の増大が骨形成に関与することを示した。さらに軟骨下骨の硬さ変化は、軟骨細胞のメカノレスポンス機構に影響を与える可能性を新たに示した。

研究 1 では、これまで緩徐に軟骨変性が進行するとされてきた DMM モデルにおける関節不安定性による剪断力と半月板機能不全による圧縮応力の増大に着眼し、DMM モデルの関節不安定性を抑制する CATR モデルを確立した。さらに、CATR モデルでは DMM モデルで生じる軟骨変性を抑制することを明らかにした。さらに、DMM モデルと CATR モデルでは半月板変性が同程度生じていることから、CATR モデルは関節不安定性による剪断力のみ軽減するモデルであることを示した。

研究 2 では研究 1 で確立した CATR モデルと DMM モデルに加えて、ACL-T モデルと CATT モデルを加え、ACL と半月板の機能の違いに着目して生体内での異なるメカニカルストレスの増減を再現し、関節軟骨と軟骨下骨の変化を解析した。その結果、関節不安定性を有する ACL-T モデルと DMM モデルでは初期軟骨変性の特徴である軟骨細胞の肥大化が確認された。しかし、関節不安定性を抑制した CATT モデルと CATR モデルでは軟骨細胞の肥大化は抑制されていた。一方、軟骨下骨の変化として、ACL を切断した ACL-T 群と CATT 群の BV/TV は減少したが、半月板機能不全による圧縮応力増大が生じる DMM モデルと CATR モデルでは BV/TV が増大していた。これらから、剪断力の増大が表層の関節軟骨変性を惹起し、圧縮応力の増大は軟骨下骨の骨形成を促進する可

能性を示した。

研究 3 では、研究 2 と同様のモデルを対象に、脛骨軟骨下骨の変化を領域毎に解析した。その結果、ACL-T モデルと CATT モデルでは MP 領域の骨形成が促進されたのに対して、DMM モデルと CATR モデルでは MA、MP 領域とも BV/TV が高値を示した。ACL-T モデルと CATT モデルは共に ACL を切断しており、研究 2 で示したように前後方向の関節不安定性が増大している。その結果、膝関節における接触領域が後方に変位し、MP 領域に対する接触圧による圧縮応力が増大していることが考えられる。また、DMM モデルと CATR モデルは内側半月板の側方逸脱を共に認め、研究 1 では内側半月板の変性も同程度みられた。そのため、DMM モデルと CATR モデルでは MA 領域と MP 領域に対する圧縮応力の増大が生じていると考えられる。したがって、接触領域の変化や半月板の機能不全による圧縮応力の増大が軟骨下骨の骨形成を引き起こすことを明らかにした。

研究 1-3 では膝関節のみを対象に検証を行ってきた。そこで、研究 4 では、発育期のマウスの股関節を対象に後肢懸垂による圧縮応力の減少を再現し、骨格形成における圧縮応力の減少が与える影響を検証し、メカニカルストレスの役割を明らかにすることを目的とした。その結果、後肢懸垂による圧縮応力の減少は軟骨内骨化プロセスを遅延させ、BV/TV の低下を示すことを明らかとした。さらに、この影響は後肢懸垂終了後の期間では回復しなかったことから、発育期におけるメカニカルストレスの減少による影響は長期に残存する可能性が示唆された。

これまでの成果をもとに、研究 5 では軟骨下骨の硬さ変化を再現した新規の培養基材(加工ゲル)を用いて軟骨細胞を培養し、剪断力に対する軟骨細胞のメカノレスポンス機構を評価した。その結果、ゲルの硬さに

よって同一強度の剪断力に対する軟骨細胞のメカノレスポンスが異なる可能性を明らかにした。これは、これまで適度なメカニカルストレスは軟骨保護に作用し、過度なメカニカルストレスは軟骨変性を引き起こすとするメカニカルストレスの強度依存的作用に対して、適度か過度を決める要因の一つに軟骨下骨の硬さがあることを新たに示すものである。

以上の結果を総括すると、剪断力や圧縮応力といったメカニカルストレスの種類に対して、骨軟骨組織は異なるメカノレスポンス機構を持つことを示唆した。さらに、軟骨下骨の硬さ変化など一方の組織の変化は他方の組織のメカノレスポンスに影響する骨軟骨相互作用がメカノレスポンス機構に関与する可能性を示した。これらの知見は、関節疾患の発症・進行メカニズムにおける骨軟骨組織のメカノレスポンスの基盤を明らかにするものである。さらに、メカニカルストレスの種類特異的な骨軟骨組織のメカノレスポンス機構を示すことで、関節疾患の発症や進行を予防するリハビリテーション確立へ向けた基礎データとなる。

今後の展望としては、*in vivo*、*in vitro* 双方からの検証を継続し、軟骨と軟骨下骨の相互作用に踏み込んだ検証を実施する必要があると考えている。具体的に、*in vivo* での検証ではこれまでに確立したモデルを用いた検証の中で *in vivo* イメージングによる検証や、関節軟骨・軟骨下骨から mRNA、タンパク質を別々に採取し解析を行うことで、変性順序やその中での変動因子の解析などを行うことで骨軟骨の相互作用を検証していく。*in vitro* での検証では、加工ゲルを用いた検証を継続していくとともに、軟骨細胞だけでなく、破骨細胞や骨芽細胞との共培養条件下での検証も必要であると考えている。共培養条件下での各細胞のメカノレスポンスを評価することで、各細胞の相互作用をより詳細に検証していく必要がある。

9. 発表論文・学会発表・獲得助成金一覧

9.1. 発表論文

1. **Arakawa K**, Takahata K, Enomoto S, Oka Y, Ozone K, Morosawa K, Murata K, Kanemura N, Kokubun T. Effect of Suppression of Rotational Joint Instability on Cartilage and Meniscus Degeneration in Mouse Osteoarthritis Model. *Cartilage*. 2022;13(1).
DOI: 10.1177/19476035211069239
2. **Arakawa K**, Takahata K, Enomoto S, Oka Y, Ozone K, Nakagaki S, Murata K, Kanemura N, Kokubun T. The difference in joint instability affects the onset of cartilage degeneration or subchondral bone changes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022;30(3):451460.
DOI: 10.1016/j.joca.2021.12.002
3. **Arakawa K**, Takahata K, Usami Y, Kokubun T. Characteristic differences in tibial subchondral bone changes in the post-traumatic knee osteoarthritis model. *bioRxiv*. (Preprint)
DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.02.27.530166>

9.2. 学会発表

1. **Arakawa K**, Takahata K, Saaya E, Murata K, Kanemura N, Kokubun T. Effect of suppression joint instability on subchondral bone remodeling. *Osteoarthritis Research Society International*. 2022, April (査読あり・ポスター)
2. **Arakawa K**, Takahata K, Saaya E, Murata K, Kanemura N, Kokubun T. Effect of suppression of joint instability in different models on cartilage degeneration and subchondral bone changes. *Orthopedic Research Society*. 2022, March (査読あり・ポスター)

3. **Arakawa K**, Takahata K, Oka Y, Ozone K, Enomoto S, Murata K, Kanemura N, Kokubun T. Differences in the progression of articular cartilage and subchondral bone degeneration between mouse models. *Osteoarthritis Research Society International*. 2021, May (査読あり・Web開催)
4. **Arakawa K**, Takahata K, Oka Y, Ozone K, Nakagaki S, Morosawa K, Murata K, Kanemura N, Kokubun T. Effect of suppression of joint instability on cartilage and meniscus degeneration. *Orthopedic Research Society*. 2021, February (査読あり・Web開催)
5. **荒川航平**, 大山智子, 高島啓, 国分貴徳. 基質硬度の違いが培養軟骨細胞の表現型に与える影響. 第35回日本軟骨代謝学会 2023年3月 (査読あり・ポスター)
6. **荒川航平**, 大内勇人, 高島啓, 国分貴徳. メカニカルストレスの減少が発育期の股関節形成に与える影響. 第31回埼玉県理学療法学会 2023年1月 (査読あり・ポスター)
7. **荒川航平**, 高島啓, 榎本沙彩, 国分貴徳. 異なるモデルにおける部位ごとの脛骨軟骨下骨の骨構造変化の違い. 第27回日本基礎理学療法学会学術大会 2022年10月 (査読あり・ポスター)
8. **荒川航平**, 高島啓, 榎本沙彩, 村田健児, 金村尚彦, 国分貴徳. 関節不安定性の抑制が軟骨下骨骨構造変化に与える影響. 第30回埼玉県理学療法学会 2022年1月 (査読あり・ポスター)
9. **荒川航平**, 高島啓, 岡優一郎, 小曾根海知, 榎本沙彩, 村田健児, 金村尚彦, 国分貴徳. メカニカルストレスの違いが変形性膝関節症発症メカニズムに与える影響. 第26回日本基礎理学療法学会学術大会 2021年12月 (査読あり・ポスター)

9.3. 獲得助成金

1. 令和2年度 埼玉県理学療法士協会研究助成金（採択番号；20-06）
研究課題名：関節不安定性の抑制が軟骨下骨構造変化に与える影響の解明. 金額：137,000 円
2. 令和3年度 埼玉県理学療法士協会研究助成金（採択番号；21-02）
研究課題名：メカニカルストレスの減少が発育期の股関節形成に与える影響の解明. 金額：99,350 円

10. 謝辞

本研究を遂行するにあたり審査ならびに貴重なご指導を賜りました，埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究科の金村尚彦教授，廣渡祐史教授には指導補助教員として様々な視点からご指導を賜りました．同学理学療法学科の村田健児助教には，実験手法や解析手法，研究結果の解釈について多くのご助言を賜りました．同学大学院の高畠啓先生には，本研究の実施にあたり，多くのご協力をいただきました．ここに深く感謝しますとともに，御礼申し上げます．また，国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構の大山智子先生，大山廣太郎先生には加工ゲルの提供，技術指導を賜りました．ここに深く感謝しますとともに，御礼申し上げます．

最後に，本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり，多大なるご指導ご鞭撻を賜りました，指導教員の埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究科の国分貴徳准教授に深謝いたします．

11. 引用文献

1. Stewart HL, Kawcak CE. The importance of subchondral bone in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Vet Sci* (2018);5(AUG):1-9. doi:10.3389/fvets.2018.00178
2. Gabay O, Hall DJ, Berenbaum F, Henrotin Y, Sanchez C. Osteoarthritis and obesity: Experimental models. *Jt Bone Spine* (2008);75(6):675-679. doi:10.1016/j.jbspin.2008.07.011
3. Andriacchi TP, Favre J. The Nature of In Vivo Mechanical Signals That Influence Cartilage Health and Progression to Knee Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* (2014);16(11):1-8. doi:10.1007/s11926-014-0463-2
4. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Cohort profile: Research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *Int J Epidemiol* (2009);39(4):988-995. doi:10.1093/ije/dyp276
5. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T, Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: The research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab* (2009);27(5):620-628. doi:10.1007/s00774-009-0080-8
6. Yoshimura N, Muraki S, Nakamura K, Tanaka S. Epidemiology of the locomotive syndrome: The research on

- osteoarthritis/osteoporosis against disability study 2005–2015. *Mod Rheumatol* (2017);27(1):1-7.
doi:10.1080/14397595.2016.1226471
7. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet* (2007);370(9597):1508-1519. doi:10.1016/S0140-6736(07)60457-7
 8. Guilak F, Meyer BC, Ratcliffe A, Mow VC. The effects of matrix compression on proteoglycan metabolism in articular cartilage explants. *Osteoarthr Cartil* (1994);2(2):91-101.
doi:10.1016/S1063-4584(05)80059-7
 9. Quinn TM, Grodzinsky AJ, Hunziker EB, Sandy JD. Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants. *J Orthop Res* (1998);16(4):490-499. doi:10.1002/jor.1100160415
 10. Stolberg-Stolberg JA, Furman BD, William Garrigues N, Lee J, Pisetsky DS, Stearns NA, Defrate LE, Guilak F, Olson SA. Effects of cartilage impact with and without fracture on chondrocyte viability and the release of inflammatory markers. *J Orthop Res* (2013);31(8):1283-1292. doi:10.1002/jor.22348
 11. Natoli RM, Scott CC, Athanasiou KA. Temporal effects of impact on articular cartilage cell death, gene expression, matrix biochemistry, and biomechanics. *Ann Biomed Eng* (2008);36(5):780-792. doi:10.1007/s10439-008-9472-5
 12. Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res*

- (1986);No. 213:34-40. doi:10.1097/00003086-198612000-00005
13. Intema F, Hazewinkel HAW, Gouwens D, Bijlsma JWJ, Weinans H, Lafeber FPJG, Mastbergen SC. In early OA, thinning of the subchondral plate is directly related to cartilage damage: Results from a canine ACLT-menisectomy model. *Osteoarthr Cartil* (2010);18(5):691-698.
doi:10.1016/j.joca.2010.01.004
 14. Castañeda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem Pharmacol* (2012);83(3):315-323.
doi:10.1016/j.bcp.2011.09.018
 15. Bellido M, Lugo L, Roman-Blas JA, Castañeda S, Caeiro JR, Dapia S, Calvo E, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Arthritis Res Ther* (2010);12(4).
doi:10.1186/ar3103
 16. Fazzalari NL, Parkinson IH. Fractal properties of subchondral cancellous bone in severe osteoarthritis of the hip. *J Bone Miner Res* (1997);12(4):632-640.
doi:10.1359/jbmr.1997.12.4.632
 17. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, Lu SB. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: Potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthr Cartil* (2014);22(8):1077-1089.

doi:10.1016/j.joca.2014.05.023

18. Goldring SR. Alterations in periarticular bone and cross talk between subchondral bone and articular cartilage in osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* (2012);4(4):249-258. doi:10.1177/1759720X12437353
19. Goldring SR. The Role of Bone in Osteoarthritis Pathogenesis. *Rheum Dis Clin North Am* (2008);34(3):561-571. doi:10.1016/j.rdc.2008.07.001
20. Giorgi M, Carriero A, Shefelbine SJ, Nowlan NC. Effects of normal and abnormal loading conditions on morphogenesis of the prenatal hip joint: Application to hip dysplasia. *J Biomech* (2015);48(12):3390-3397. doi:10.1016/j.jbiomech.2015.06.002
21. Giorgi M, Carriero A, Shefelbine SJ, Nowlan NC. Mechanobiological simulations of prenatal joint morphogenesis. *J Biomech* (2014);47(5):989-995. doi:10.1016/j.jbiomech.2014.01.002
22. Felson DT. Osteoarthritis as a disease of mechanics. *Osteoarthr Cartil* (2013);21(1):10-15. doi:10.1016/j.joca.2012.09.012
23. Bryan Finlay J, Repo RU. Instrumentation and Procedure for the Controlled Impact of Articular Cartilage. *IEEE Trans Biomed Eng* (1978);BME-25(1):34-39. doi:10.1109/TBME.1978.326375
24. Iijima H, Ito A, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Kiyon W, Nakahata A, Zhang J, Wang T, Aoyama T, Nishitani K, Kuroki

- H. Physiological exercise loading suppresses post-traumatic osteoarthritis progression via an increase in bone morphogenetic proteins expression in an experimental rat knee model. *Osteoarthr Cartil* (2017);25(6):964-975.
doi:10.1016/j.joca.2016.12.008
25. Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Zhang X, Tajino J, Kuroki H. Effects of exercise level on biomarkers in a rat knee model of osteoarthritis. *J Orthop Res* (2013);31(7):1026-1031. doi:10.1002/jor.22332
 26. Berman AG, Clauser CA, Wunderlin C, Hammond MA, Wallace JM. Structural and mechanical improvements to bone are strain dependent with axial compression of the tibia in female C57BL/6 mice. *PLoS One* (2015);10(6):1-16.
doi:10.1371/journal.pone.0130504
 27. Wang L, You X, Lotinun S, Zhang L, Wu N, Zou W. Mechanical sensing protein PIEZO1 regulates bone homeostasis via osteoblast-osteoclast crosstalk. *Nat Commun* (2020);11(1):1-12.
doi:10.1038/s41467-019-14146-6
 28. SS G, Blanchet T, Morris E. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129 / SvEv mouse. 2007:1061-1069. doi:10.1016/j.joca.2007.03.006
 29. Eleftherios A. Makris, Pasha Hadidi, BS KAA. The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials* (2011);32(30)(October):7411-7431.

doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.037.The

30. Ikuta F, Yoneta K, Miyaji T, Kidera K, Yonekura A, Osaki M, Gamada K. Knee kinematics of severe medial knee osteoarthritis showed tibial posterior translation and external rotation: a cross-sectional study. *Aging Clin Exp Res* (2020);32(9):1767-1775. doi:10.1007/s40520-019-01361-w
31. Nagano Y, Naito K, Saho Y, Torii S, Ogata T, Nakazawa K, Akai M, Fukubayashi T. Association between in vivo knee kinematics during gait and the severity of knee osteoarthritis. *Knee* (2012);19(5):628-632. doi:10.1016/j.knee.2011.11.002
32. Weidow J, Tranberg R, Saari T, Kärrholm J. Hip and knee joint rotations differ between patients with medial and lateral knee osteoarthritis: Gait analysis of 30 patients and 15 controls. *J Orthop Res* (2006);24(9):1890-1899. doi:10.1002/jor.20194
33. Englund M, Guermazi A, Roemer FW, Aliabadi P, Yang M, Lewis CE, Torner J, Nevitt MC, Sack B, Felson DT. Meniscal tear in knees without surgery and the development of radiographic osteoarthritis among middle-aged and elderly persons: The multicenter osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* (2009);60(3):831-839. doi:10.1002/art.24383
34. Badlani JT, Borrero C, Golla S, Harner CD, Irrgang JJ. The effects of meniscus injury on the development of knee osteoarthritis: Data from the osteoarthritis initiative. *Am J Sports Med* (2013);41(6):1238-1244.

doi:10.1177/0363546513490276

35. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthr Cartil* (2010);18(SUPPL. 3):S17-S23.
doi:10.1016/j.joca.2010.05.025
36. Kwok J, Onuma H, Olmer M, Lotz MK, Grogan SP, D'Lima DD. Histopathological analyses of murine menisci: Implications for joint aging and osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* (2016);24(4):709-718. doi:10.1016/j.joca.2015.11.006
37. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthr Cartil* (2005);13(7):632-641.
doi:10.1016/j.joca.2005.03.004
38. Murata K, Kanemura N, Kokubun T, Fujino T, Morishita Y, Onitsuka K, Fujiwara S, Nakajima A, Shimizu D, Takayanagi K. Controlling joint instability delays the degeneration of articular cartilage in a rat model. *Osteoarthr Cartil* (2017);25(2):297-308. doi:10.1016/j.joca.2016.10.011
39. Murata K, Kokubun T, Onitsuka K, Oka Y, Kano T, Morishita Y, Ozone K, Kuwabara N, Nishimoto J, Isho T, Takayanagi K, Kanemura N. Controlling joint instability after anterior cruciate ligament transection inhibits transforming growth

- factor-beta-mediated osteophyte formation. *Osteoarthr Cartil* (2019);27(8):1185-1196. doi:10.1016/j.joca.2019.03.008
40. Zhao YP, Liu B, Tian QY, Wei JL, Richbourgh B, Liu CJ. Progranulin protects against osteoarthritis through interacting with TNF- α and β -Catenin signalling. *Ann Rheum Dis* (2015);74(12):2244-2253. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205779
41. Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov* (2013);12(2):147-168. doi:10.1038/nrd3930
42. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol* (2014);26(3):253-266. doi:10.1016/j.smim.2014.05.004
43. Wang P, Guan PP, Guo C, Zhu F, Konstantopoulos K, Wang ZY. Fluid shear stress-induced osteoarthritis: Roles of cyclooxygenase-2 and its metabolic products in inducing the expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *FASEB J* (2013);27(12):4664-4677. doi:10.1096/fj.13-234542
44. Herwig J, Egner E, Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* (1984);43(4):635-640. doi:10.1136/ard.43.4.635
45. Proctor CS, Schmidt MB, Whipple RR, Kelly MA, Mow VC. Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J Orthop Res* (1989);7(6):771-782. doi:10.1002/jor.1100070602

46. Oka Y, Murata K, Kano T, Ozone K, Arakawa K, Kokubun T, Kanemura N. Impact of Controlling Abnormal Joint Movement on the Effectiveness of Subsequent Exercise Intervention in Mouse Models of Early Knee Osteoarthritis. *Cartilage* 2019. doi:10.1177/1947603519885007
47. Adebayo OO, Ko FC, Goldring SR, Goldring MB, Wright TM, van der Meulen MCH. Kinematics of meniscal- and ACL- transected mouse knees during controlled tibial compressive loading captured using roentgen stereophotogrammetry. *J Orthop Res* (2017);35(2):353-360. doi:10.1002/jor.23285
48. Nomura M, Sakitani N, Iwasawa H, Kohara Y, Takano S, Wakimoto Y, Kuroki H, Moriyama H. Thinning of articular cartilage after joint unloading or immobilization. An experimental investigation of the pathogenesis in mice. *Osteoarthr Cartil* (2017);25(5):727-736. doi:10.1016/j.joca.2016.11.013
49. Wen C, Lu WW, Chiu KY. Importance of subchondral bone in the pathogenesis and management of osteoarthritis from bench to bed. *J Orthop Transl* (2014);2(1):16-25. doi:10.1016/j.jot.2013.11.004
50. Fang H, Huang L, Welch I, Norley C, Holdsworth DW, Beier F, Cai D. Early Changes of Articular Cartilage and Subchondral Bone in The DMM Mouse Model of Osteoarthritis. *Sci Rep* (2018);8(1):1-9. doi:10.1038/s41598-018-21184-5
51. Willie BM, Birkhold AI, Razi H, Thiele T, Aido M, Kruck B,

Schill A, Checa S, Main RP, Duda GN. Diminished response to in vivo mechanical loading in trabecular and not cortical bone in adulthood of female C57Bl/6 mice coincides with a reduction in deformation to load. *Bone* (2013);55(2):335-346.

doi:10.1016/j.bone.2013.04.023

52. De Souza RL, Matsuura M, Eckstein F, Rawlinson SCF, Lanyon LE, Pitsillides AA. Non-invasive axial loading of mouse tibiae increases cortical bone formation and modifies trabecular organization: A new model to study cortical and cancellous compartments in a single loaded element. *Bone* (2005);37(6):810-818. doi:10.1016/j.bone.2005.07.022
53. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Tajino J, Nagai M, Zhang X, Yamaguchi S, Akiyama H, Kuroki H. Immature articular cartilage and subchondral bone covered by menisci are potentially susceptible to mechanical load. *BMC Musculoskelet Disord* (2014);15(1):1-12. doi:10.1186/1471-2474-15-101
54. McNulty AL, Guilak F. Mechanobiology of the meniscus. *J Biomech* (2015);48(8):1469-1478. doi:10.1016/j.jbiomech.2015.02.008
55. Ota S, Sasaki E, Sasaki S, Chiba D, Kimura Y, Yamamoto Y, Kumagai M, Ando M, Tsuda E, Ishibashi Y. Relationship between abnormalities detected by magnetic resonance imaging and knee symptoms in early knee osteoarthritis. *Sci Rep* (2021);11(1):1-9. doi:10.1038/s41598-021-94382-3
56. Shurma L, Chmiel JS, Almagor O, Dorothy D, Ali G, Bathon J,

- Nevitt. M, Eaton C, Hochberg M, Jackson R, Kwok K, Mysiw WJ, Crema M, Roemer F. Significance of Pre-Radiographic MRI Lesions in Persons at Higher Risk for Knee Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* (2014);66(7):1811-1819. doi:10.1002/art.38611. Significance
57. Sun Y, Mauerhan DR, Honeycutt PR, Kneisl JS, Norton JH, Hanley EN, Gruber HE. Analysis of meniscal degeneration and meniscal gene expression. *BMC Musculoskelet Disord* (2010);11. doi:10.1186/1471-2474-11-19
58. Englund M, Guermazi A, Roemer FW, Aliabadi P, Yang M, Lewis CE, Torner J, Nevitt MC, Sack B, Felson DT. Meniscal tear in knees without surgery and the development of radiographic osteoarthritis among middle-aged and elderly persons: The multicenter osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* (2009);60(3):831-839. doi:10.1002/art.24383
59. Arakawa K, Takahata K, Enomoto S, Oka Y, Ozone K, Morosawa K, Murata K, Kanemura N, Kokubun T. Effect of Suppression of Rotational Joint Instability on Cartilage and Meniscus Degeneration in Mouse Osteoarthritis Model. *Cartilage* (2022);13(1). doi:10.1177/19476035211069239
60. Arakawa K, Takahata K, Enomoto S, Oka Y, Ozone K, Nakagaki S, Murata K, Kanemura N, Kokubun T. The difference in joint instability affects the onset of cartilage degeneration or subchondral bone changes. *Osteoarthr Cartil* (2022);30(3):451-460. doi:10.1016/j.joca.2021.12.002

61. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Tajino J, Nagai M, Zhang X, Yamaguchi S, Akiyama H, Kuroki H. Destabilization of the medial meniscus leads to subchondral bone defects and site-specific cartilage degeneration in an experimental rat model. *Osteoarthr Cartil* (2014);22(7):1036-1043. doi:10.1016/j.joca.2014.05.009
62. Yeow CH, Lau ST, Lee PVS, Goh JCH. Damage and degenerative changes in menisci-covered and exposed tibial osteochondral regions after simulated landing impact compression - A porcine study. *J Orthop Res* (2009);27(8):1100-1108. doi:10.1002/jor.20861
63. Thambyah A, Nather A, Goh J. Mechanical properties of articular cartilage covered by the meniscus. *Osteoarthr Cartil* (2006);14(6):580-588. doi:10.1016/j.joca.2006.01.015
64. Arunakul M, Tochigi Y, Goetz JE, Diestelmeier BW, Heiner AD, Rudert J, Fredericks DC, Brown TD, McKinley TO. Replication of chronic abnormal cartilage loading by medial meniscus destabilization for modeling osteoarthritis in the rabbit knee in vivo. *J Orthop Res* (2013);31(10):1555-1560. doi:10.1002/jor.22393
65. Bansal S, Miller LM, Patel JM, Meadows KD, Eby MR, Saleh KS, Martin AR, Stoeckl BD, Hast MW, Elliott DM, Zgonis MH, Mauck RL. Transection of the medial meniscus anterior horn results in cartilage degeneration and meniscus remodeling in a large animal model. *J Orthop Res* (2020);38(12):2696-2708.

doi:10.1002/jor.24694

66. Cabahug-Zuckerman P, Frikha-Benayed D, Majeska RJ, Tuthill A, Yakar S, Judex S, Schaffler MB. Osteocyte Apoptosis Caused by Hindlimb Unloading is Required to Trigger Osteocyte RANKL Production and Subsequent Resorption of Cortical and Trabecular Bone in Mice Femurs. *J Bone Miner Res* (2016);31(7):1356-1365. doi:10.1002/jbmr.2807
67. Keune JA, Branscum AJ, Wong CP, Iwaniec UT, Turner RT. Effect of Leptin Deficiency on the Skeletal Response to Hindlimb Unloading in Adult Male Mice. *Sci Rep* (2019);9(1):1-14. doi:10.1038/s41598-019-45587-0
68. Nomura M, Sakitani N, Iwasawa H, Kohara Y, Takano S, Wakimoto Y, Kuroki H, Moriyama H. Thinning of articular cartilage after joint unloading or immobilization. An experimental investigation of the pathogenesis in mice. *Osteoarthr Cartil* (2017);25(5):727-736. doi:10.1016/j.joca.2016.11.013
69. Cunningham HC, Orr S, Murugesu DK, Hsia AW, Osipov B, Go L, Wu PH, Wong A, Loots GG, Kazakia GJ, Christiansen BA. Differential bone adaptation to mechanical unloading and reloading in young, old, and osteocyte deficient mice. *Bone* (2023);167(October 2022). doi:10.1016/j.bone.2022.116646
70. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Yamaguchi S, Nagai M, Tajino J, Zhang X, Kuroki H. Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-

- induced osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* (2015);23(9):1563-1574. doi:10.1016/j.joca.2015.04.015
71. Nam J, Aguda BD, Rath B, Agarwal S. Biomechanical thresholds regulate inflammation through the NF- κ B pathway: Experiments and modeling. *PLoS One* (2009);4(4). doi:10.1371/journal.pone.0005262
72. Yokota H, Goldring MB, Sun H Bin. CITED2-mediated Regulation of MMP-1 and MMP-13 in Human Chondrocytes under Flow Shear. *J Biol Chem* (2003);278(47):47275-47280. doi:10.1074/jbc.M304652200
73. Zhu F, Wang P, Kontogianni-Konstantopoulos A, Konstantopoulos K. Prostaglandin (PG)D² and 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ², but not PGE², mediate shear-induced chondrocyte apoptosis via protein kinase A-dependent regulation of polo-like kinases. *Cell Death Differ* (2010);17(8):1325-1334. doi:10.1038/cdd.2010.13
74. Oyama TG, Oyama K, Kimura A, Yoshida F, Ishida R, Yamazaki M, Miyoshi H, Taguchi M. Collagen hydrogels with controllable combined cues of elasticity and topography to regulate cellular processes. *Biomed Mater* (2021);16(4). doi:10.1088/1748-605X/ac0452
75. Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* (2008);3(8):1253-1260. doi:10.1038/nprot.2008.95
76. Miyoshi H, Adachi T. Topography design concept of a tissue

- engineering scaffold for controlling cell function and fate through actin cytoskeletal modulation. *Tissue Eng - Part B Rev* (2014);20(6):609-627. doi:10.1089/ten.teb.2013.0728
77. Murphy WL, McDevitt TC, Engler AJ. Materials as stem cell regulators. *Nat Mater* (2014);13(6):547-557. doi:10.1038/nmat3937
78. Yang Y, Wang K, Gu X, Leong KW. Biophysical Regulation of Cell Behavior—Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography. *Engineering* (2017);3(1):36-54. doi:10.1016/J.ENG.2017.01.014
79. Anselme K, Wakhloo NT, Rougerie P, Pieuchot L. Role of the Nucleus as a Sensor of Cell Environment Topography. *Adv Healthc Mater* (2018);7(8):1-17. doi:10.1002/adhm.201701154
80. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, Pajeroski JD, Spinler KR, Shin JW, Tewari M, Rehfeldt F, Speicher DW, Discher DE. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* (80-) (2013);341(6149). doi:10.1126/science.1240104
81. Caliri SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods* (2016);13(5):405-414. doi:10.1038/nmeth.3839
82. Iijima H, Gilmer G, Wang K, Bean AC, He Y, Lin H, Tang WY, Lamont D, Tai C, Ito A, Jones JJ, Evans C, Ambrosio F. Age-related matrix stiffening epigenetically regulates α -Klotho

- expression and compromises chondrocyte integrity. *Nat Commun* (2023);14(1):1-18. doi:10.1038/s41467-022-35359-2
83. Duan M, Xia S, Liu Y, Pu X, Chen Y, Zhou Y, Huang M, Pi C, Zhang D, Xie J. Stiffened fibre-like microenvironment based on patterned equidistant micropillars directs chondrocyte hypertrophy. *Mater Today Bio* (2023);20(May):100682. doi:10.1016/j.mtbio.2023.100682
84. Nicodemus GD, Bryant SJ. Mechanical loading regimes affect the anabolic and catabolic activities by chondrocytes encapsulated in PEG hydrogels. *Osteoarthr Cartil* (2010);18(1):126-137. doi:10.1016/j.joca.2009.08.005
85. Freyria AM, Cortial D, Ronzière MC, Guerret S, Herbage D. Influence of medium composition, static and stirred conditions on the proliferation of and matrix protein expression of bovine articular chondrocytes cultured in a 3-D collagen scaffold. *Biomaterials* (2004);25(4):687-697. doi:10.1016/S0142-9612(03)00568-4
86. Zhao Y, Richardson K, Yang R, Bousraou Z, Lee YK, Fasciano S, Wang S. Notch signaling and fluid shear stress in regulating osteogenic differentiation. *Front Bioeng Biotechnol* (2022);10(October):1-14. doi:10.3389/fbioe.2022.1007430